

Humane Antikörper und ImmunRNasen zur Behandlung von CD30⁺ Lymphomen

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Xenia Karola Wezler
aus Hildesheim

1. Referent:	Professor Dr. Stefan Dübel
2. Referent:	apl. Professor Dr. Robert Hänsch
eingereicht am:	27.02.2012
mündliche Prüfung (Disputation) am:	14.05.2012

Druckjahr 2012

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Wezler, X., Dübel, S. und Schirrmann, T.: „Improved antibody RNase fusion proteins targeting CD30⁺ lymphoma” (Poster), 8^{er} RNase Kongress, Neapel, Italien (2010)

Schirrmann, T., Wezler, X. und Dübel, S.: „Human antibody RNase fusion proteins targeting CD30⁺ lymphoma“, 8^{er} RNase Kongress, Neapel, Italien (2010)

Dübel, S., Menzel, C., Schirrmann, T., Hust, M., Konthur, Z., Wezler, X. und Jostock, T.: „Human RNase fusion proteins for tumor therapy“, CHI's Molecular Medicine Tri-Conference, San Francisco (2010)

Zusammenfassung

Einen vielversprechenden Ansatz zur Behandlung maligner Lymphome stellen tumorspezifische Antikörper dar, deren antitumorale Wirkung durch die Fusion mit RNasen noch erhöht werden kann. Nach der spezifischen Bindung derartiger ImmunRNasen an ein internalisierendes Antigen auf der Zelloberfläche und der Translokation in das Zytoplasma, können die RNasen durch Abbau der zellulären RNA den Zelltod auslösen. Als Antigen bietet sich u.a. CD30 an, da es auf Hodgkin- und einigen Non-Hodgkin-Lymphomzellen überexprimiert ist, aber nur auf sehr wenigen gesunden menschlichen Zellen vorkommt.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung humaner Antikörper und ImmunRNasen zur Bekämpfung von CD30⁺ Lymphomen und der Vergleich der acht enzymatisch aktiven RNasen 1-8 der humanen RNase A Superfamilie als Effektordomäne der ImmunRNasen.

Zunächst erfolgte die Analyse der humanen RNasen 1-8. Da die Produktion der freien RNasen nur mit sehr geringen Ausbeuten möglich war, wurden Fusionsproteine aus dem humanen IgG1-Fc-Teil und den RNasen in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) produziert. Dies war für alle RNasen erfolgreich, aber nur die RNasen 1, 4, 5 und 7 ließen sich anschließend durch Spaltung mit einer sequenzspezifischen Protease separieren. Diese RNasen wurden hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität und deren Inhibition durch den humanen RNase-Inhibitor (RI) analysiert. Interessanterweise korrelierte die geringe Inhibition der RNasen 1 und 7 mit deren hohem Glykosylierungsgrad.

Für die spezifische Tumorbindung wurden vier neue, aus einer humanen naiven Antikörpergenbibliothek isolierte CD30-spezifische Antikörper als scFv-Fragmente in *E. coli* sowie als IgG-ähnliche scFv-Fc Antikörper in Säugerzellen produziert. Der Antikörper SH313-B5 wies eine hohe Affinität für CD30 ($3,3 \cdot 10^{-8}$ M) und die stärkste spezifische Bindung an rekombinantes Antigen sowie CD30⁺ Lymphomzellen auf. Er wurde daher im scFv-Fc Antikörperformat als neue *Targeting*-Domäne für die vollständig humanen ImmunRNasen ausgewählt.

Die humanen RNasen 1-8 wurden mit dem scFv-Fc Antikörper SH313-B5 über verschiedene Peptidlinker fusioniert. Neben einem flexiblen Linker wurden intrazellulär spaltbare Adapter untersucht, die eine verbesserte Translokation in das Zytoplasma und dort eine Freisetzung der RNase vom Antikörper ermöglichen sollten. Die ImmunRNasen ließen sich in Säugerzellen produzieren und wiesen die erwarteten ribonukleolytischen Aktivitäten auf, deren Hemmung durch den RI je nach Glykosylierungsgrad variierte. Die ImmunRNasen banden spezifisch an CD30⁺ Lymphomzellen und wurden in die Zellen aufgenommen. Der Antikörper SH313-B5-hFc bewirkte allein bereits eine halbmaximale Proliferationsinhibition der CD30⁺ Lymphomzellen bei einer Konzentration von 100 nM. Die Fusion dieses Antikörpers mit bestimmten RNasen verstärkte diesen Effekt in Abhängigkeit des eingesetzten Linkers. Der Einsatz der RNase3 mit einem flexiblen, aber nicht-spaltbaren Linker bewirkte den stärksten Effekt gegenüber CD30⁺ Lymphomzellen mit einer 50 %igen Wachstumshemmung bei 1 nM.

Summary

A promising approach for the treatment of malignant lymphomas is the use of tumorspecific antibodies. Their antitumoral effect can be approved by fusion with RNases. After specific binding of such ImmunoRNases to an internalizing antigen on the cell surface and the translocation into cytoplasm the RNases can lead to cell death by degrading the cellular RNA. The surface antigen CD30 is a suitable target, because it is overexpressed on the cell surface of Hodgkin- and some Non-Hodgkin lymphomas, while it is rarely present on healthy human cells.

The aim of this work was the examination of human antibodies and ImmunoRNases for the treatment of CD30⁺ lymphomas and the comparison of the eight RNases 1-8 from the human RNase A Superfamily as effector domains.

At first the human RNases 1-8 were analyzed. The production of the free RNases was only possible with low yields. Therefore fusion proteins with the human IgG1-Fc-part and the RNases were produced in human embryonic kidney cells (HEK293). All RNases were successfully produced as Fc fusion protein, but only RNases 1, 4, 5 and 7 could be separated by cleavage with a site-specific protease. These RNases were analyzed regarding their enzymatic activity and their inhibition by the human RNase inhibitor (RI). Interestingly, weak inhibition of the RNases 1 and 7 correlated with their high glycosylation pattern.

For the specific tumor binding four new CD30-specific antibodies from a human naïve antibody gene library were produced as scFv-fragments in *E. coli* and as IgG-like scFv-Fc antibodies in mammalian cells. The antibody SH313-B5 had a high affinity of $3.3 \cdot 10^{-8}$ M for CD30 and showed the best specific binding to recombinant antigen and CD30⁺ lymphoma cells. The scFv-Fc format of SH313-B5 was chosen as new targeting domain for studying different fully human ImmunoRNases.

The human RNases 1-8 were fused to the scFv-Fc antibody SH313-B5 via different peptide linker including a flexible glycine serine linker as well as intracellular cleavable adapters. The latter should allow better translocation into cytoplasm and the release of the RNases from the antibody. The ImmunoRNases were produced in mammalian cells successfully. They had the expected ribonucleolytic activity, whose inhibition by the RI differed depending on the glycosylation of the RNase moiety. The ImmunoRNases bound specifically to CD30⁺ lymphoma cells and their internalization in the cells were proven. The antibody SH313-B5-hFc alone already caused strong inhibition of proliferation of CD30⁺ lymphoma cells with an IC₅₀-value of 100 nM. The fusion of the antibody with certain RNases increased this effect depending on the used linker. The use of RNase3 with a flexible, but not-cleavable linker showed the strongest effect on CD30⁺ lymphoma cells with a 50 % growth inhibition at 1 nM.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Inhaltsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Ribonukleasen	1
1.1.1 Die RNase A Superfamilie	1
1.1.2 Humane RNasen	3
RNase1	4
RNase2 und RNase3	5
RNase4	5
RNase5	5
RNase6	6
RNase7 und RNase8	6
Vergleich der acht klassischen humanen RNasen	6
1.1.3 Internalisierung von RNasen	8
1.1.4 RNase-Inhibitor (RI)	8
1.2 Antikörper	9
1.2.1 Antikörperklassen und -aufbau	9
1.2.2 Antikörperformate	11
1.2.3 Antikörperbasierte Krebstherapien	12
Unkonjugierte Antikörper	13
Antikörperkonjugate und -fusionen	16
1.3 ImmunRNasen	20
1.4 Der Tumormarker CD30	22
1.4.1 Eigenschaften des Tumormarkers CD30	22
1.4.2 CD30 ⁺ Erkrankungen	24
Hodgkin-Lymphome (HL)	24
Non-Hodgkin-Lymphome (NHL)	25
Andere CD30 ⁺ Tumore	26
Therapie der HL und NHL	26
2 Zielsetzung der Arbeit	28
3 Material und Methoden	29
3.1 Material	29
3.1.1 Geräte	29
3.1.2 Computerprogramme und Datenbanken	30
3.1.3 Verbrauchsmaterialien	31
3.1.4 Kits und Säulen	31
3.1.5 Enzyme und zugehörige Puffer	32

3.1.6 Antiseren und kommerzielle Antikörper.....	32
3.1.7 Chemikalien, Lösungen und Puffer	32
3.1.8 Mikroorganismen und Zelllinien.....	36
3.1.9 Medien und Supplemente.....	36
3.1.10 Vektoren	37
3.1.11 Oligonukleotide.....	37
3.1.12 Sonstiges.....	39
3.2 Methoden	40
3.2.1 Allgemeines	40
Sterilisation und Medien	40
3.2.2 Molekulargenetische Methoden	40
Isolierung von Plasmid-DNA	40
Polymerasekettenreaktion (PCR).....	40
QuikChange® Site-Directed Mutagenesis	41
Isolation des RNase8-Gens aus humaner cDNA.....	41
Agarose-Gelelektrophorese	42
Reinigung von DNA-Proben.....	42
Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop.....	42
Restriktionsverdau und Dephosphorylierung	42
Ligation.....	43
Kolonie-PCR.....	43
Sequenzierung	43
3.2.3 Mikrobiologische Methoden.....	43
Bestimmung der Zelldichte.....	43
Lagerung von Mikroorganismen - Glycerinstock.....	44
Transformation von E. coli mittels Hitzeschock.....	44
Produktion von scFv-Antikörperfragmenten in E. coli	44
3.2.4 Biochemische und -physikalische Methoden	44
Ammoniumsulfatfällung von Kulturüberstand.....	44
Isolation der periplasmatischen Fraktion von E. coli.....	44
Proteolytischer Verdau mit TEV-Protease	45
Reinigung von Proteinen	45
SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	46
Coomassiefärbung	47
Silberfärbung	47
Proteinquantifizierung.....	47
Western Blot.....	48
Immunfärbung	48
Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	48
Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)	49
Analytische Größenausschlusschromatographie.....	49

Stabilitätsanalyse	50
RNase-Aktivitätstest	50
RNase-Inhibitionstest	51
Markierung von Proteinen mit einem pH-sensitiven Farbstoff	51
3.2.5 Zellbiologische Methoden	52
Kultivierung von humanen Zellen	52
Auftauen und Einfrieren von humanen Zellen	52
Bestimmung der Zellzahl und Zellviabilität	52
Produktion von Proteinen in humanen Zellen	53
Viabilitätstest (MTT-Test)	53
Durchflusszytometrie	54
Konfokale Laser Scanning Mikroskopie	55
4 Ergebnisse	57
4.1 Humane RNasen	57
4.1.1 Isolierung des Gens der humanen RNase8	57
4.1.2 Konstruktion von RNase-Expressionsvektoren	57
4.1.3 Produktion und Reinigung humaner RNasen	58
Produktion von RNasen mit verschiedenen sekretorischen Signalpeptiden	58
Produktion von hFc-TEV _{cs} -RNase Fusionsproteinen und Spaltung mittels TEV-Protease	59
4.1.4 Bestimmung der RNaseaktivität	62
4.1.5 Inhibition der RNaseaktivität durch den RNase-Inhibitor	63
4.1.6 Übersicht über die Eigenschaften der RNasen	64
4.2 Antigen CD30	66
4.2.1 Produktion und Reinigung von rekombinantem CD30-mFc	66
4.3 CD30-spezifische Antikörper	67
4.3.1 Produktion und Reinigung von Antikörpern	67
4.3.2 Bindung an rekombinantes Antigen CD30-mFc im ELISA	68
4.3.3 Bindung an rekombinantes CD30-mFc im Western Blot	68
4.3.4 Bestimmung der Dimer- und Multimerbildung der scFv-Fragmente mittels Größenausschlusschromatographie	69
4.3.5 Bestimmung der Affinität mittels Oberflächenplasmonenresonanz	70
4.3.6 Bindung an CD30 ⁺ Lymphomzellen	72
4.3.7 Übersicht über die Eigenschaften der Antikörper	73
4.4 ImmunRNasen	74
4.4.1 Konstruktion von Antikörper-RNase Fusionsproteinen mit verschiedenen Linkern	74
4.4.2 Produktion und Reinigung von scFv-Fc-RNase Fusionsproteinen	75
4.4.3 Bestimmung von Proteinkomplexen mittels Größenausschlusschromatographie	76
4.4.4 Bestimmung der RNaseaktivität	77
4.4.5 Inhibition der RNaseaktivität	77
4.4.6 Bindung der ImmunRNasen an CD30 ⁺ Lymphomzellen	79

4.4.7 Einfluss der ImmunRNasen mit dem spaltbaren Adapter auf die Viabilität von CD30 ⁺ Lymphomzellen	80
4.4.8 Stabilitätsanalyse.....	83
4.4.9 Internalisierung der ImmunRNasen in CD30 ⁺ Zellen	84
Nachweis der Internalisierung mittels Durchflusszytometrie.....	84
Nachweis der Internalisierung mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie	85
4.4.10 Analysen zum Einfluss der ImmunRNasen mit dem Glycin-Serin-Linker auf die Viabilität von CD30 ⁺ Lymphomzellen.....	87
5 Diskussion	89
5.1 Produktion und biochemische Charakterisierung der humanen RNasen 1-8	90
5.2 Produktion und Charakterisierung neuer CD30-spezifischer Antikörper	96
5.3 Humane Antikörper und ImmunRNasen zur Behandlung von CD30⁺ Lymphomen.....	99
5.4 Fazit	110
6 Ausblick	111
7 Abkürzungsverzeichnis	112
8 Abbildungsverzeichnis	116
9 Tabellenverzeichnis	118
10 Literaturverzeichnis	119
11 Danksagung.....	127
A Anhang.....	128

1 Einleitung

1.1 Ribonukleasen

Ribonukleasen (RNasen) katalysieren die Spaltung von Ribonukleinsäure (RNA) an den Phosphodiesterbindungen und können dadurch diverse biologische Funktionen ausüben. Sie wirken bei der DNA-Replikation mit und kontrollieren die Genexpression auf Ebene der Transkription und der Translation. Weiterhin beeinflussen sie die RNA-Reifung, das -*Splicing* und die -Interferenz und spielen eine Rolle bei der Wirtsabwehr, der Nährstoffregeneration und dem Zelltod [1-4]. RNasen können sowohl intra- als auch extrazellulär vorkommen und spalten die RNA entweder nach einem endo- oder exonukleolytischen Mechanismus [2, 4]. Je nach Substratspezifität der RNase werden doppel- oder einzelsträngige RNA-Bereiche oder Hybride aus RNA und Desoxyribonukleinsäure (DNA) gespalten. RNasen sind ubiquitär nachweisbar und können je nach Anzahl der an der Katalyse beteiligten Metallionen in drei große Klassen mit mehreren Familien und Unterfamilien eingeteilt werden [1, 2].

Zu der Klasse der RNasen, die zwei Metallionen für den enzymatischen Prozess benötigen, zählt z.B. die RNase H, die an der DNA-Replikation beteiligt ist. Weiterhin gehören die bakterielle RNase III und die eukaryotischen RNasen *Dicer* und *Drosha* in diese Klasse, die bei der RNA-Interferenz eine Rolle spielen. Einige wenige RNasen katalysieren die Reaktion mit einem Metallion, während ein Großteil ohne Beteiligung eines Metallions wirkt [2]. Zu den drei am besten untersuchten Familien dieser Klasse gehören die T1-, die T2- und die RNase A Superfamilie. Die Mitglieder der T1 Superfamilie sind nur bakterielle und fungale RNasen wie z.B. die extrazelluläre Barnase aus *Bacillus amyloliquefaciens* und ihre fungalen Homologa. Die T2-Superfamilie umfasst eine Vielzahl von RNasen aus Protozoen, Pflanzen, Bakterien, Viren und Tieren. Diese beiden Familien weisen keine Homologien zu der dritten Familie - der RNase A Superfamilie - auf, deren Mitglieder nur in Wirbeltieren vorkommen [1, 2, 5].

1.1.1 Die RNase A Superfamilie

Der Prototyp der RNase A Superfamilie ist die bovine pankreatische RNase A, bei der es sich um das am besten charakterisierte Enzym unter allen bekannten Säugetierenzymen handelt [5]. Sie wurde zuerst von René Dubois im Jahr 1938 isoliert [6] und ist das erste Enzym, dessen Aminosäuresequenz aufgeklärt wurde. Die Arbeiten an der bovinen RNase A umfassen eine ausführliche Charakterisierung hinsichtlich der Chemie des Proteins, seiner Faltung und Stabilität, sowie der Enzymologie und der molekularen Evolution. Die Kristallstruktur ist bereits vor mehr als 60 Jahren aufgeklärt worden. Für die Arbeit an der bovinen RNase A sind insgesamt vier Nobelpreise vergeben worden [7].

Die Vertreter der RNase A Superfamilie sind untereinander strukturell sehr homolog, werden aber einer Vielzahl an Unterfamilien aus Säugetieren und anderen Vertebraten zugeordnet und je nach Herkunft unterschiedlich benannt [8]. Die Superfamilie weist eine hohe Rate an Genduplikationen und -verlusten auf, die zu einer unterschiedlichen Anzahl von Genen in verschiedenen Spezies geführt hat [9].

Bei allen Mitgliedern dieser Superfamilie handelt es sich um extrazelluläre Proteine, die spezifische Sequenzelemente und eine Disulfidbrücken-gestützte Tertiärstruktur teilen [5]. Die dadurch bedingte hohe Strukturhomologie zwischen Mitgliedern der Familie unterschiedlicher Herkunft wird durch Abbildung 1-1 verdeutlicht.

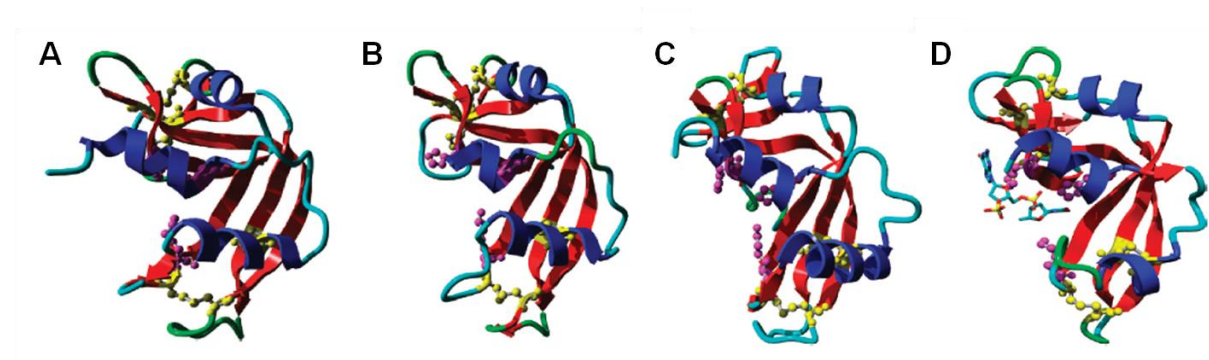


Abbildung 1-1: Struktur von vier Mitgliedern der RNase A Superfamilie

Bovine RNase A (A); humane pankreatische RNase (RNase1) (B); humane RNase5 (Angiogenin) (C); Onconase (*Rana pipiens*) (D) [4]

Der katalytische Mechanismus ist bei allen ribonukleolytisch aktiven RNasen identisch [4, 5]. Das RNA-Rückgrat wird durch die Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen gespalten. Die Spaltung findet zwischen der 3'-Phosphatgruppe eines Ribonukleotides und der 5'-Hydroxylgruppe des benachbarten Nukleotides statt, wobei die Enzyme unterschiedliche Aktivitäten gegenüber den Pyrimidinen und Purinen bzw. doppel- und einzelsträngiger RNA aufweisen [2, 7, 10-15].

Evolutionäre Studien lassen vermuten, dass die Mitglieder der RNase A Superfamilie ursprünglich der Wirtsabwehr in Wirbeltieren dienten [4]. Viele Mitglieder haben neben der katalytischen Aktivität gegenüber spezifischen RNA-Substraten eine Vielzahl an unterschiedlichen physiologischen und biologischen Funktionen entwickelt, die teilweise unabhängig von der ribonukleolytischen Aktivität sind [4, 6, 9, 16, 17]. Sie werden daher in die Gruppe der sogenannten „RISBASES“ (engl. *Ribonucleases with Special Biological Actions*) eingeteilt [6]. Neben dem Abbau von durch die Nahrung aufgenommener Fremd-RNA im Verdauungstrakt wirken einige z.B. auch bei der Angiogenese und der angeborenen Immunität mit. Weiterhin sind antibakterielle, antivirale, zytotoxische sowie antitumorale Wirkungen beschrieben worden [4, 6, 9, 16, 17].

1.1.2 Humane RNasen

Das humane Genom umfasst die Gene von 13 RNasen der Superfamilie A, die alle auf dem langen Arm des Chromosoms 14 lokalisiert sind (Abbildung 1-2) [5]. Von diesen 13 RNasen weisen acht (RNase 1-8) eine katalytische Aktivität auf, während für die anderen fünf RNasen 9-13 keine ribonukleolytische Aktivität nachgewiesen werden kann [18]. Die acht aktiven RNasen 1-8 formen ein Gen-Cluster von 368 kb und werden als klassische RNasen bezeichnet [5, 19].

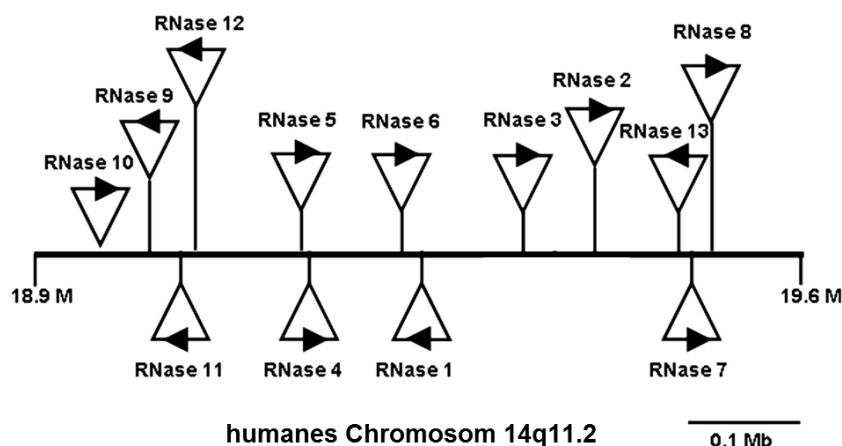


Abbildung 1-2: Chromosomale Lokalisation der humanen RNase-Gene

Lokalisation und Orientierung der Gene aller Mitglieder der humanen RNase A Superfamilie auf dem Chromosom 14. Die Sequenzen der RNasen 1-8 kodieren für katalytisch aktive RNasen, während die Sequenzen der RNasen 9-13 für potentiell funktionale Gene kodieren (verändert nach [5]).

Die acht klassischen RNasen sind extrazelluläre Proteine, deren Sekretion durch eine Signalsequenz vermittelt wird [5]. Die reifen Proteine weisen im unglykosylierten Zustand molekulare Massen von 14-17 kDa auf und sind damit sehr klein [16]. Durch unterschiedliche posttranslationale Modifikationen wie z.B. Glykosylierungen entstehen verschiedene Varianten desselben Genproduktes. Sie alle haben eine katalytische Triade (His, His, Lys) und vier interne Disulfidbrücken, die durch acht Cysteine gebildet werden. RNase5 bildet dabei eine Ausnahme und besitzt lediglich drei Disulfidbrücken durch sechs Cysteinreste. Auch die fünf nicht-klassischen RNasen 9-13 weisen die typische Disulfidstruktur und die katalytische Triade auf, ihnen fehlen aber andere spezifische Elemente, die für eine ribonukleolytische Aktivität notwendig sind. Die dreidimensionalen Strukturen der RNasen 1-5 weisen ähnliche Konformationen mit drei α -Helices und fünf β -Faltblättern auf. Die Strukturen der RNasen 1-5 und 7 haben eine starke Homologie zu der bovinen RNase A, während für RNase6 und RNase8 noch keine Strukturvorschläge vorliegen [5, 16, 19].

Die RNasen können je nach Struktur und katalytischer bzw. biologischer Funktion in vier Gruppen eingeteilt werden. Anhand von phylogenetischen Analysen lässt sich eine evolutionäre Beziehung zwischen den RNasen 1, 4 und 5 herstellen, während die RNasen 2, 3, 6, 7 und 8 eine separate Gruppe bilden. Innerhalb dieser Gruppe bilden die RNasen 2 und

3 sowie die RNasen 7 und 8 wiederum jeweils eine eigenständige Gruppe, wohingegen RNase 6 eine eigene Gruppe darstellt (Abbildung 1-3) [5, 20].

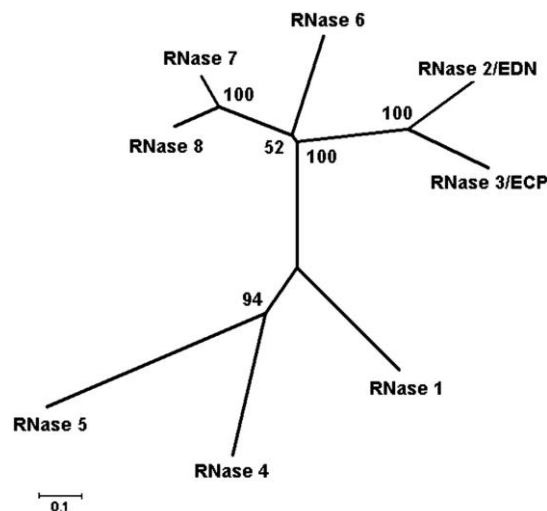


Abbildung 1-3: Phylogenetischer Baum der humanen RNasen 1-8

Die humanen RNasen 2, 3, 6, 7 und 8 sind nah miteinander verwandt und formen eine separate Gruppe von den RNasen 1, 4 und 5 [5].

Im Menschen sind die RNasen im ganzen Körper in verschiedenen Organen, Geweben und Körperflüssigkeiten verteilt. Der Großteil der RNasen konnte bereits auf Proteinebene detektiert werden, während manche nur über die vorhandene mRNA nachgewiesen wurden (Tabelle 1-1) [5].

Tabelle 1-1: Lokalisation der acht klassischen humanen RNasen im Körper (nach [5])

Bezeichnungen	Lokalisation
RNase1 HPR (<i>human pancreatic RNase</i>)	Pankreas, Niere, Gehirn, Urin, Samenflüssigkeit
RNase2 EDN (<i>eosinophil-derived neurotoxin</i>)	Eosinophile Granulozyten, Milz, Leber, Niere, Plazenta, Urin
RNase3 ECP (<i>eosinophil cationic protein</i>)	Eosinophile Granulozyten
RNase4	Plasma, Leber*, Pankreas*, Lunge*, Herz*, Niere*, Plazenta*
RNase5 Angiogenin (ANG)	Blutserum
RNase6 RNase K6	Lunge*, Herz*, Gehirn*, Leber*, Niere*, Skelettmuskel*, Plazenta*, Pankreas*
RNase7	Epithel, respiratorischer Trakt*, Genitaltrakt*, Leber*, Niere*, Skelettmuskel*, Herz*, PBMC*
RNase8	Plazenta, PBMC*

* in diesen Geweben wurde mRNA-Transkript der jeweiligen RNase gefunden

RNase1

Die humane RNase1, auch HPR (engl. *human pancreatic RNase*) genannt, ist in sehr vielen verschiedenen Organen, Geweben und Körperflüssigkeiten zu finden. Ihre posttranslationalen Modifikationen, vor allem die Glykosylierungsmuster, variieren sehr stark je nach Lokalisation im Körper. Wegen ihrer hohen extrazellulären Konzentration wird von wichtigen physiologischen Funktionen ausgegangen. Die hohe Expressionsrate in Endothelzellen und

die schnelle Freisetzung in den Blutkreislauf weisen auf eine Beteiligung bei der Regulierung der Hämostase hin [5]. Die RNase1 hat eine hohe ribonukleolytische Aktivität, wobei sie Poly-Cytidin vor Poly-Uridin als Substrat bevorzugt. Außerdem kann für sie auch die Degradation von Poly-Adenosin und DNA-RNA-Hybriden nachgewiesen werden [5]. Sie weist weiterhin von allen RNasen der Wirbeltiere die stärkste Aktivität zum Abbau von doppelsträngiger RNA auf [10].

RNase2 und RNase3

Die RNasen 2 und 3 sind aus einer Genduplikation entstanden und haben sich rasch und stark durch Mutationen verändert [5, 18]. Ihre Aminosäuresequenz ist zu 67 % identisch [5]. Sie werden aus den eosinophilen Granulozyten sekretiert und sind Neurotoxine, weswegen sie auch EDN (engl. *eosinophil-derived neurotoxin*) und ECP (engl. *eosinophil cationic protein*) genannt werden. Trotz ihrer ähnlichen Struktur weisen sie sehr unterschiedliche Eigenschaften auf. Während RNase2 eine vergleichbar hohe ribonukleolytische Aktivität gegenüber Hefe-tRNA wie RNase1 aufweist, ist die Aktivität von RNase3 um zwei Potenzen niedriger [5]. Beide bevorzugen Poly-Uridin vor Poly-Cytidin als Substrat und bauen weder Poly-Adenosin noch doppelsträngige RNA ab [5, 15]. RNase2 weist antivirale Eigenschaften auf und kann die Reifung und Chemotaxis von dendritischen Zellen fördern [5]. RNase3 hingegen hat sowohl antibakterielle, antivirale wie auch antiparasitäre Eigenschaften und inhibiert darüber hinaus auch das Wachstum von Säugetierzellen. Diese Zelltoxizität ist dabei wahrscheinlich unabhängig von der ribonukleolytischen Aktivität und wird auf die Destabilisierung der Zellmembran durch die RNase zurückgeführt. Die aromatischen und kationischen Aminosäuren auf der Proteinoberfläche verstärken eine Anheftung an Zelloberflächen und vermitteln die Zerstörung von Lipidmembranen [5, 21-23].

RNase4

Die RNase4 unterscheidet sich in vielerlei Hinsicht von den anderen RNasen der RNase A Superfamilie. Sie weist durch einen verkürzten C-Terminus die kürzeste Aminosäuresequenz auf und ist unter den verschiedenen Säugetierarten sehr hoch konserviert. Das Protein ist unglykosyliert und bindet mit einer 17-fach höheren Affinität an den RNase-Inhibitor als die bovine RNase A. RNase4 weist als einzige eine stark ausgeprägte und eindeutige Spezifität für eines der beiden Pyrimidine als Substrat auf. Die Spezifität für Uridin ist auf den verkürzten C-Terminus der RNase zurückzuführen. Er ist an der Ausbildung der Pyrimidin-Bindungsstelle am Aktiven Zentrum beteiligt und formt dieses für das präferierte Erkennen von Uridin statt Cytidin [5, 14, 24].

RNase5

Die RNase5 wird wegen ihrer Haupteigenschaft - der Förderung der Angiogenese - auch Angiogenin genannt. Diese Eigenschaft ist unter den RNasen einmalig und macht die

RNase5 zusammen mit ihrer extrem schwachen ribonukleolytischen Aktivität und der starken Inhibition durch den RNase-Inhibitor zu einem untypischen Vertreter der RNase A Superfamilie [5, 24, 25]. Ihre geringe ribonukleolytische Aktivität könnte durch die sterische Behinderung der Pyrimidinbindung durch die Aminosäure Glu117 erklärt sein [14]. Nach der Bindung der RNase5 an Endothelzellen und der Translokation in den Zellkern über ein Kernlokalisierungssignal wird die Blutgefäßneubildung durch die RNase5 in Abhängigkeit ihrer ribonukleolytischen Aktivität stimuliert. Die RNase5 wird bei Entzündungsprozessen induziert und kann ihre Wundheilungs- und antimikrobiellen Eigenschaften im Sinne der Wirtsabwehr entfalten. Sie ist in hohen Konzentrationen im Serum vorhanden und zirkuliert im Blutkreislauf. Hohe Serumlevel könnten ein Indiz für einen soliden Tumor sein, dessen Versorgung und Wachstum durch die angiogene Wirkung der RNase5 begünstigt wird. Der Zusammenhang zwischen hohen Serumkonzentrationen und Tumorwachstum wurde bereits in vielen klinischen Studien untersucht und die Eignung als unterstützende Diagnosemethode bei soliden Tumoren analysiert [6, 25].

RNase6

Die RNase6 ist wahrscheinlich an der Immunabwehr beteiligt, konnte aber bislang nur als mRNA-Transkript im menschlichen Körper detektiert werden. Sie ist auch unter dem Namen RNase K6 bekannt und noch nicht hinsichtlich der Substratspezifität oder ihrer katalytischen Eigenschaften untersucht worden. Ihre ribonukleolytische Aktivität gegenüber Hefe-tRNA ist 40-fach schwächer als die von RNase2 [5, 20].

RNase7 und RNase8

Die RNasen 7 und 8 sind aus einer Genduplikation entstanden und haben eine zu 78 % identische Aminosäuresequenz. Dennoch sind ihre physiologischen Funktionen sehr unterschiedlich. Die ribonukleolytische Aktivität der RNase7 ist gegenüber Hefe-tRNA nur 8-fach schwächer als die von RNase1 [5], wohingegen die RNase8 eine der niedrigsten Aktivitäten der acht klassischen humanen RNasen aufweist [26]. Während die RNase7 in vielen Organen und Geweben vorkommt, konnte die Existenz der RNase8 lediglich in der Plazenta nachgewiesen werden, wo sie durch ihre antibakteriellen Eigenschaften vermutlich einen Schutz vor Infektionen darstellt. Die RNase7 hat eine stärker ausgeprägte antibakterielle Wirkung, die durch ihre Eigenschaft Membranen zu durchdringen bedingt ist. Die Wirkung ist unabhängig von der ribonukleolytischen Aktivität und richtet sich sogar noch bei 4 °C gegen viele grampositive und -negative Bakterien [5, 26, 27].

Vergleich der acht klassischen humanen RNasen

Abbildung 1-4 verdeutlicht die Aminosäurehomologien der acht klassischen humanen RNasen 1-8. Die Aminosäuren der katalytischen Triade, die konservierten Aminosäuren

sowie die an der Disulfidbrückenbildung beteiligten Cysteine sind markiert. Die RNasen 4 und 5 haben am N-Terminus jeweils eine ebenfalls gekennzeichnete Pyroglutaminsäure.

RNase4	–\$QDG–MYQRFLRQHVVHPEET–GGSDRYCNLMMQRRKMTLYHCKRFNTFIHEDIWNIRSI	56
RNase5	–\$QDNSRYTHFLTQHYYDAKPQ–GRDDRYCESIMRRRGLTS–PCKDINTFIHGKRSIKAI	56
RNase1	--KES–RAKKFQRQHMDSDSSPSSSSTYCNQMMRRRNMTQGRCKPVNTFVHEPLVDVQNV	57
RNase2	KPPQFTWAQWFETQHINMTSQ-----QCTNAMQVINNYQRRCKNQNTFLLTTFANVVNV	54
RNase3	RPPQFTRAQWFATQHISLNPP-----RCTIAMRAINNYRWRCKNQNTFLRTTFANVVNV	54
RNase7	KPKGMTSSQWFKIQHMQPSPQ-----ACNSAMKNINKHTKCKDLNTFLHEPFSSVAAT	54
RNase8	KPKDMTSSQWFKTQHVQPSQ-----ACNSAMSIINKYTERCKDLNTFLHEPFSSVAIT	54
RNase6	WPKRLTKAHWFEIQHIQPSPL-----QCNRAMSGINNYTQHCKHQNTFLHDSFQNVAAV	54
	* * ! * * * ! **	
RNase4	CSTTNIQCKNGK--MNCHEG--VVKVTDRCRDGTSS--RAPNCRYRAIASTRRVVIACE--	108
RNase5	CENKNGNPHREN--LRISKS--SFQVTTCKLHGG--PWPPCQYRATAGFRNVVVACE--	108
RNase1	CFQEKVTCKNGQ--GNCYKSNSMHTDCRLTNGS--RYPNCAYRTSPKERHIIIVACE--	111
RNase2	CGNPNMTCPSNKTRKNCHHSGSQVPLIHCNLTTPSPQNISNCRYAQTPANMFYIVACDNR	114
RNase3	CGNQSIRCPHNRTLNNCHRSRFRVPLLHCDLINPGAQNISNCRYADRPGRRFYVACDNR	114
RNase7	CQTPKIACKNGD--KNCHQSHGFPVSLTMCKLTSG--KYPNCRYKEKRQNKSYVVACK–P	108
RNase8	CQTPNIACKNSC--KNCHQSHGPMSTLMGELTSG--KYPNCRYKEKHLNTPYIVACD–P	108
RNase6	CDLLSIVCKNRR--HNCHQSSKPVNMTDCRLTSG--KYPQCRYSAQAQYKFFIVACD–P	108
	* * * * * * *	
RNase4	-----GNPQVPVHFDG-----	119
RNase5	-----NG--LPVHLDQSIFFRP	123
RNase1	-----GSPYVPVHFDASVEDST	128
RNase2	DQRRDPPQYPVVPVHLDRII----	134
RNase3	DPR–DSPRYPVVPVHLDTTI----	133
RNase7	PQKKDSQQFHLVPVHLDKVV----	128
RNase8	PQQGDPG–YPLVPVHLDKVV----	127
RNase6	PQKSDPP–YKLVPVHLDKVV----	127
	** ! *	

§ Pyroglutaminsäure

* Cysteine / konservierte AS

! AS der katalytischen Triade

Abbildung 1-4: Aminosäure-Alignment der acht klassischen humanen RNasen

Das Alignment wurde mit dem Programm ClustalW2 durchgeführt und verändert.

In Tabelle 1-2 sind die wichtigsten Eigenschaften der acht klassischen humanen RNasen 1-8 zusammengefasst.

Tabelle 1-2: Übersicht über die wichtigsten Eigenschaften der acht klassischen humanen RNasen 1-8
[5, 14, 18, 21-31]

RNase	biologische Eigenschaften	ribonukleo-lytische Aktivität	Substrat-spezifität	Glyko-sylierung	pI-Wert	molekulare Masse [kDa]
1	zytotoxisch	hoch	C>U	ja	9,0	15,0
2	antiviral	hoch	C>U	ja	9,2	16,3
3	zytotoxisch, antiviral, antibakteriell, antiparasitär	sehr gering	U>C	ja	10,7	16,0
4		hoch	U>>C	nein*	9,2	14,3
5	angiogen, antimikrobiell	extrem gering	C>U	nein*	9,7	14,6
6		gering		ja	9,2	15,1
7	antibakteriell	gering		ja	9,8	15,0
8	antibakteriell	sehr gering		nein*	8,6	14,7

* keine N-Glykosylierungsstellen vorhanden

1.1.3 Internalisierung von RNasen

Die zytotoxische Wirkung der RNasen beruht vermutlich auf der Bindung an bestimmte Zellen und der Internalisierung und anschließenden Translokation in das Zytoplasma, wo durch den Abbau der RNA die Proteinsynthese gehemmt und dadurch der Zelltod ausgelöst wird [6]. Das Ausmaß der Internalisierung und die Freisetzung in das Zytoplasma stellt dabei für die Zytotoxizität einen limitierenden Faktor dar [32, 33].

Die Bindung der RNasen an die Zelloberfläche findet wahrscheinlich unabhängig von einem Rezeptor statt [4, 32]. Die RNasen verfügen über eine einzelne Domäne, die für die Bindung an Zelloberflächen, die Internalisierung und die katalytische Aktivität verantwortlich ist, und werden über saure Vesikel durch einen Dynamin-unabhängigen Prozess in die Zellen aufgenommen. Die Translokation unterscheidet sich von der anderer Toxine. Der vollständige Mechanismus ist noch ungeklärt, aber es konnte nachgewiesen werden, dass weder das saure Milieu der Endosomen noch ein Transport zum Endoplasmatischen Retikulum notwendig sind [32].

1.1.4 RNase-Inhibitor (RI)

Der humane RNase-Inhibitor wurde ursprünglich aus der Plazenta isoliert [11]. Das ~50 kDa große Protein macht einen Anteil von bis zu 0,01 % der zytosolischen Proteine von Säugerzellen aus [7]. Die spezifische Inhibition der ribonukleolytischen Aktivität wird durch eine 1:1-Bindung mit Affinitäten bis zu 10^{-15} M erreicht, wobei die Inhibitionskonstanten je nach RNase um bis zu 10 Potenzen variieren [7, 11, 34]. Durch Kristallstrukturen des RI-RNase-Komplexes wurde gezeigt, dass diese starke und enge Bindung durch Wasserstoffbrücken und Coulomb-Kräfte zustande kommt [7].

Der RI schützt die Zellen vor eindringenden RNasen. Je höher seine Affinität zu einer RNase ist, desto weniger zytotoxisch kann diese wirken. Nur wenn die RNase in der Lage ist der RI-Bindung teilweise oder ganz zu entgehen und ihre katalytische Aktivität beizubehalten, wirkt sie als Zelltoxin. Die starke Wechselwirkung zwischen den RNasen und dem RI wird durch einzelne Aminosäuren beeinflusst, was durch deren Austausch bewiesen werden konnte [7, 32, 34].

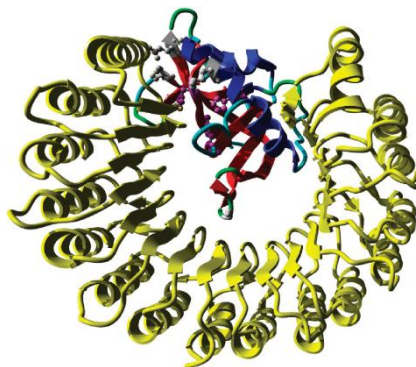


Abbildung 1-5: Struktur eines RI-RNase-Komplexes
Komplex aus humaner RNase1 (farbig) und RI (gelb) [4].

1.2 Antikörper

Die Aufgabe des Immunsystems ist der Schutz des Körpers vor pathogenen Fremdkörpern. Zu dem Immunsystem der Wirbeltiere (Vertebraten ab der Überklasse der *Gnathostomata*) gehört neben der angeborenen auch die adaptive Immunabwehr. Deren Bestandteile sind die antigenpräsentierenden Zellen, die T- und B-Lymphozyten und die Antikörper (Immunglobuline). Letztere erkennen und binden hochspezifisch an körperfremde Substanzen (Antigene) und sind die Vermittler der humoralen Immunantwort. Diese kann je nach beteiligtem Immunglobulinisotypen die Opsonisierung, die direkte Inaktivierung des Pathogenen durch Akkumulation (Neutralisation) und die Aktivierung des Komplementsystems oder weiterer Bestandteile des Immunsystems beinhalten. Die Antikörper werden von den B-Lymphozyten gebildet und in das Blut bzw. die Lymphe sezerniert [35].

1.2.1 Antikörperklassen und -aufbau

Die fünf Immunglobulinisotypen des Menschen werden anhand ihrer schweren Ketten eingeteilt und weisen charakteristische Unterschiede in Anzahl und Lokalisation von Glykosylierungen, Disulfidbrücken und konstanten Domänen auf. Die Hauptisotypen sind IgA, IgD, IgE, IgG und IgM, wobei sich IgA und IgG weiter in IgA1 und IgA2 bzw. IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 aufteilen. Der Isotyp eines Antikörpers bestimmt die Art der von ihm vermittelten Immunantwort. Tabelle 1-3 informiert über die Isotypen und ihre Aufgaben im menschlichen Körper [35].

Tabelle 1-3: Überblick über die humanen Immunglobulinisotypen und ihre Aufgaben [35]

Isotyp	Form	Aufgabe
IgA	Dimer	Schutz vor Pathogenen
IgD	Monomer	Unbekannte Funktion
IgE	Monomer	Schutz vor Parasiten, Auslösen allergischer Reaktionen
IgG	Monomer	Verzögerter Schutz, Wiedererkennung eines Antigens über einen langen Zeitraum
IgM	Pentamer	Erstschutz bei akutem Antigenkontakt

Der Erstkontakt mit dem Antigen (Antigen-Stimulus) leitet die primäre Immunantwort des Körpers ein. An der Erkennung und Bindung der körperfremden Substanz sind hauptsächlich die Antikörper der Klasse IgM beteiligt. Anschließend können in den B-Lymphozyten die Affinitätsreifung des Antikörpers und ein Isotypenwechsel von IgM hin zu IgG, IgE oder IgA erfolgen [35].

Die Zusammensetzung der Grundstruktur der Antikörper aus vier Polypeptidketten ist konserviert. Ein klassisches Antikörpermonomer, z.B. vom Isotyp IgG, besteht aus jeweils zwei identischen schweren (engl. *heavy*, H) und zwei identischen leichten (engl. *light*, L) Aminosäureketten mit einer molekularen Gesamtmasse von ~150 kDa. Dabei beträgt die Masse einer schweren Kette ~50 kDa und die einer leichten Kette ~25 kDa. Die Stabilität des

Antikörpers wird durch Disulfidbrücken und nicht-kovalente Bindungen zwischen den Aminosäureketten gewährleistet [35, 36].

In Abbildung 1-6 ist der schematische Aufbau eines Antikörpers vom Isotyp IgG dargestellt. Die schweren Ketten bestehen im N-terminalen Bereich aus einer variablen Region V_H , die in die konstante Domäne C_H1 übergeht. Sie ist über die sogenannte *Hinge*-Region mit den konstanten Domänen C_H2 und C_H3 verknüpft. Die *Hinge*-Region weist eine starke Flexibilität auf. Sie stabilisiert die Verknüpfung der beiden schweren Ketten durch Disulfidbrücken und starke hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Domänen.

Die leichten Ketten werden an zwei unterschiedlichen chromosomalen Orten kodiert und deshalb in zwei Arten unterteilt, die lambda(λ)- und kappa(κ)- Ketten, die sich in ihrer Funktion aber nicht unterscheiden. Das Verhältnis zwischen λ und κ beträgt beim Menschen 2:3 [37]. Am N-Terminus der leichten Ketten befindet sich eine variable Domäne V_L , während am C-Terminus eine konstante Domäne C_L ist. Die beiden Ketten sind über Disulfidbrücken zwischen C_L und C_H1 kovalent miteinander verbunden [35, 36].

Der Großteil der konstanten Regionen bildet den Fc-Teil (engl. *fragment crystallisable*) [36]. Die variablen Bereiche (Fv, engl. *fragment variable*) sind für die Antigenbindung verantwortlich und vermitteln die Spezifität des Antikörpers, die von jeweils drei hypervariablen Domänen je leichte Kette bestimmt wird. Diese sogenannten komplementaritätsbestimmenden Regionen (engl. *complementary determining regions*, CDRs) bestehen aus jeweils 3-20 Aminosäuren und werden von den weniger variablen Gerüstregionen (*framework*-Regionen) eingerahmt. Die insgesamt sechs CDR-Regionen weisen im nativ gefalteten Zustand des Antikörpers eine starke räumliche Nähe zueinander auf. Sie bilden auf der Außenseite an den N-terminalen Enden des Antikörpers das sogenannte Paratop (Antigenbindestelle), das eine komplementäre Oberfläche zu dem antigenen Gegenstück (Epitop) aufweist [35, 38, 39]. Die Antikörper-Antigen-Bindung wird durch Wasserstoffbrückenbindungen, Ionenbindungen und Van-der-Waals-Kräfte vermittelt [40].

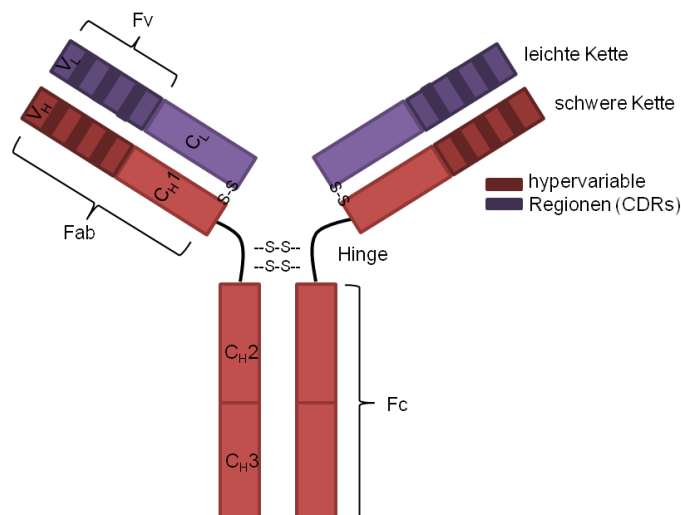


Abbildung 1-6: Schematischer Aufbau eines Antikörpers (IgG-Isotyp) (verändert nach [41])

1.2.2 Antikörperformate

Je nach Anwendungsgebiet können entweder komplette Antikörper oder einzelne bzw. zusammengesetzte Fragmente des Antikörpers hergestellt werden. Besonders in der Diagnostik und Therapie sowie für Forschungszwecke werden kleinere Antikörperformate bevorzugt. Ist die Effektorfunktion des Antikörpers für die Anwendung nicht nötig oder sogar störend, werden oft nur die antigenbindenden Fragmente eingesetzt. Sie können abhängig von dem Produktionssystem zusätzlich mit geeigneten Signalsequenzen (z.B. PelB) oder für eine anschließende Reinigung mit *tags* versehen werden. Die Expression des Fragmentes findet meist in gramnegativen Bakterien wie *E. coli* statt. Nach der Sekretion in das Periplasma der Zelle findet dort die korrekte Proteinfaltung statt, da sich die intramolekularen Disulfidbrücken wegen des dort herrschenden oxidierenden biochemischen Milieus ausbilden können [36, 42, 43]. Die Vorteile der Produktion der Antikörperfragmente liegen zum Einen in hohen Produktausbeuten und zum Anderen in der kostengünstigen Kultivierung der bakteriellen Wirtszellen. Für die Anwendung eignen sich die Antikörperfragmente aufgrund ihrer geringen Größe. Im Vergleich zu kompletten IgG-Antikörpern weisen die Fragmente eine verbesserte Penetration von soliden Tumoren auf und verteilen sich besser im Tumorgewebe. Antikörperfragmente haben eine stark reduzierte Serumhalbwertszeit, da sie aufgrund ihres geringen molekularen Gewichts schneller über die Nieren ausgeschieden werden (renale *Clearance*) [4, 36, 44].

Zu den kleinen Antikörperfragmenten zählen die Fab-Fragmente (engl. *fragment antigen binding*) und die Fv-Fragmente (engl. *fragment variable*) [36]. Die Fab-Fragmente lassen sich durch proteolytische Spaltung von kompletten Antikörpern herstellen. Diese Methode ist heutzutage aber von gentechnischen Methoden abgelöst worden, da deren Handhabung einfacher ist [44]. Weiterhin lassen sich die Antikörperfragmente dadurch mit anderen Proteinen oder Toxinen fusionieren. Fab-Fragmente bestehen aus der kompletten leichten Kette und dem V_H- und dem C_H1-Bereich der schweren Kette. Beide Ketten sind im C-terminalen Bereich über eine Disulfidbrücke kovalent miteinander verknüpft (Abbildung 1-7 A). Fv-Fragmente hingegen bestehen nur aus den variablen Regionen der leichten und der schweren Kette. Da die beiden Ketten keine kovalente Verknüpfung aufweisen, müssen die Fragmente durch einen Peptidlinker stabilisiert werden (v_H-Linker-v_L). Dadurch entsteht mit 25-30 kDa molekularer Masse die kleinste antigenbindende Einheit, das sogenannte *single chain* Fv-Fragment (scFv-Fragment) (Abbildung 1-7 B) [36]. Es werden normalerweise Peptidlinker mit 15-20 hydrophilen Aminosäuren verwendet, die die korrekte Zusammenlagerung der beiden Domänen ermöglichen [45].

Soll ein Antikörperfragment eine Effektorfunktion aufweisen, werden die Antikörperfragmente mit einem Fc-Teil fusioniert. Bei der Fusion eines scFv-Fragmentes mit einem Fc-Teil über die *Hinge*-Region entsteht ein bivalenter IgG-ähnlicher scFv-Fc Antikörper, dessen Produktion wegen der hohen Komplexität und der posttranslationalen Modifikationen effizient nur in eukaryotischen Zellen stattfinden kann (Abbildung 1-7 C) [36].

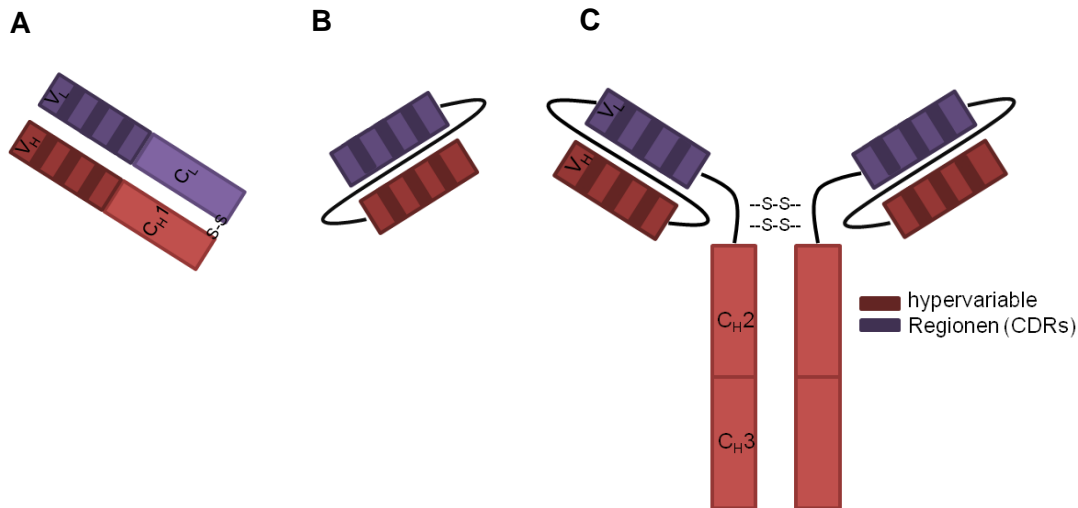


Abbildung 1-7: Schematischer Aufbau einiger Antikörperformate (Fab (A); scFv (B); scFv-Fc (C); nach [41])

1.2.3 Antikörperbasierte Krebstherapien

Die Sterblichkeitsrate bei Krebserkrankungen ist trotz enormer Fortschritte bezüglich der Therapie immer noch sehr hoch. Die konventionellen Strategien bei der Behandlung von Tumorerkrankungen umfassen neben der Bestrahlung und Chemotherapie ggf. die operative Entfernung des Tumors. Alle drei Methoden bergen Probleme, die eine vollständige Genesung verhindern können. Bei der Tumorentfernung verbleiben oftmals metastasierende Zellen im Körper, die ein Rezidiv auslösen können. Die Bestrahlung betrifft immer auch gesundes umliegendes Gewebe und die Chemotherapie ist mit Resistenzentwicklung und starken systemischen Nebenwirkungen behaftet. Aus diesem Grund wird nach alternativen Behandlungsmöglichkeiten gesucht, zu denen die antikörperbasierten Krebstherapien zählen [46].

In der Diagnostik von Krebserkrankungen werden Antikörper bereits seit Jahrzehnten erfolgreich in der Immunhistochemie und *in vitro* Immunassays sowie als Radioimmunkonjugate in bildgebenden Verfahren eingesetzt. Ein Einsatz von Antikörpern in der Therapie von Tumorerkrankungen wird seit mehr als einem Jahrhundert erforscht, aber erst in den letzten 15 Jahren haben sich derartige Produkte etabliert [47]. Rekombinante Antikörper gehören heute zu der Gruppe von biologischen Therapeutika, die am schnellsten wächst und am intensivsten in klinischen Studien untersucht wird. Die Antikörper werden in verschiedenen Formaten eingesetzt und haben vielfältige Wirkmechanismen. Neben den

unkonjugierten Antikörpern werden auch Antikörperkonjugate und -fusionen erforscht, deren Fusionspartner eine Effektorfunktion innehaben. Sie können Radionukleotide, Zytokine, Wirkstoffe bzw. Toxine oder Enzyme sein (Abbildung 1-8) [4, 47, 48].

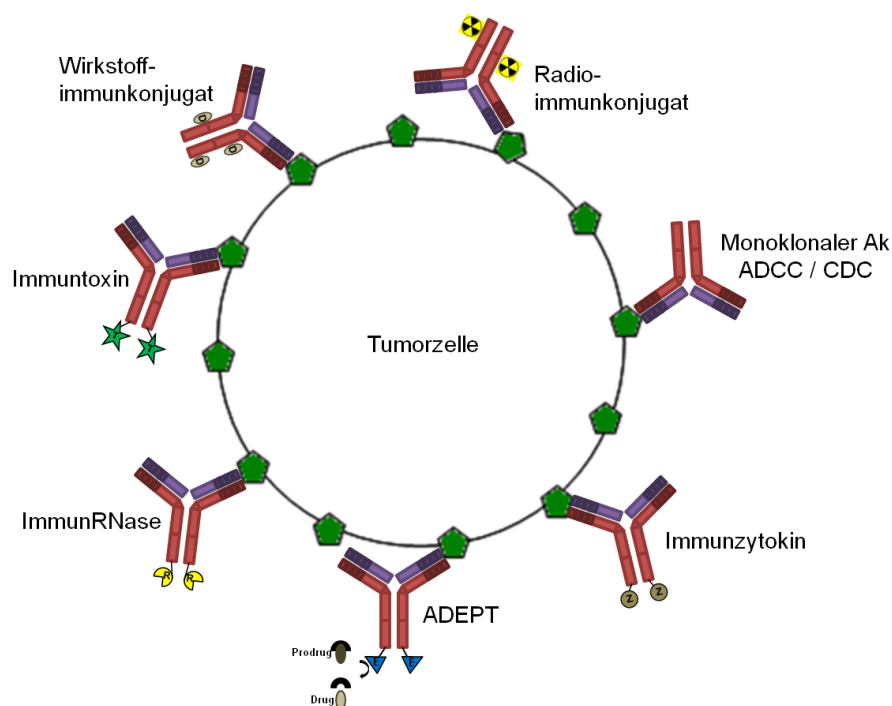


Abbildung 1-8: Übersicht über die Wirkmechanismen von Antikörpern in der Tumorthherapie

Unkonjugierte Antikörper oder Antikörperkonjugate bzw. -fusionen binden spezifisch an Oberflächenantigene auf Tumorzellen und können dort unterschiedliche Wirkmechanismen auslösen: Monoklonale unkonjugierte Antikörper können direkte Effekte auslösen (Modulation von Signaltransduktionswegen) oder weitere Immunreaktionen induzieren (CDC oder ADCC). Immunzytokine vereinen die Effektorfunktion eines Antikörpers mit der regulatorischen Funktion des Zytokins. Radioimmunkonjugate, Wirkstoffimmunkonjugate, Immuntoxine und ImmunRNasen können eine direkte Zytotoxizität auf die Tumorzelle bewirken, während andere Enzymimmunkonjugate durch die Aktivierung eines *Prodrug* wirken (ADEPT).

Unkonjugierte Antikörper

Die ersten Antikörper, die in den frühen 1980er Jahren in klinischen Studien untersucht wurden, waren monoklonale Maus-Antikörper. Aufgrund ihres sehr hohen immunogenen Charakters begannen die Forscher mit der schrittweisen Humanisierung der Antikörper. Heute ist die Generierung vollständig humaner Antikörper durch Phage-Display-Verfahren möglich. Die humanen Antikörper zeichnen sich durch eine stark reduzierte Immunogenität aus und können mit anderen Elementen des humanen Immunsystems interagieren. Komplette IgG-Antikörper haben lange physiologische Serumhalbwertszeiten, können aber aufgrund ihrer großen molekularen Masse nur schlecht in solides Tumorgewebe eindringen. Auch hochaffine Antikörper verbleiben eher auf der Tumoroberfläche anstatt ihn effektiv zu durchdringen. Dieser Effekt kann aber durch hohe Konzentrationen des Antikörpers ausgeglichen werden. Verglichen mit den gängigen Krebstherapien wie Bestrahlung und Chemotherapie wird die Behandlung mit Antikörpern auch in hohen Dosen von den Patienten gut toleriert und ist mit geringen Nebenwirkungen behaftet [47].

Die Antikörper verfügen über verschiedene zytotoxische Wirkmechanismen gegen Krebszellen. Monoklonale Antikörper können Bestandteile des Komplementsystems binden und aktivieren. Dieser als Komplement-abhängige Zytotoxizität (CDC, engl. *complement-dependent cytotoxicity*) bezeichnete Mechanismus löst direkt den Zelltod aus. Indirekte Effekte durch Antikörper werden durch das Rekrutieren von zytotoxischen Komponenten des Immunsystems wie Monozyten oder Makrophagen ausgelöst. Dazu zählt die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC, engl. *antibody dependent cellular cytotoxicity*) [47-49]. Die Antikörper können weiterhin auch Signaltransduktionswege beeinflussen und dadurch z.B. die Angiogenese stören oder durch Blockieren von Wachstumsfaktorrezeptoren die Proliferation der Krebszellen hemmen [47].

Von der amerikanischen Zulassungsbehörde „*Food and Drug Administration*“ (FDA) sind bis jetzt 12 Antikörper bzw. Antikörperkonjugate für die Behandlung von Krebserkrankungen zugelassen (Tabelle 1-4).

Tabelle 1-4: Übersicht über die FDA-zugelassenen Antikörper (-konjugate) für die Krebstherapie
(nach Zulassungsdatum sortiert, Quelle: FDA, 2011)

Antikörper	Antigen und Art	Indikation	Zulassungsdatum	
Rituxan: Rituximab	CD20; chimärer IgG1	Non-Hodgkin-Lymphome	1997 (US)	1998 (EU)
Herceptin: Trastuzumab	HER2; humanisierter IgG1	Metastasierendes Mammakarzinom	1998 (US)	2000 (EU)
Mylotarg*: Gemtuzumab ozogamicin	CD33; humanisierter IgG4, Immuntoxin	Akute myeloide Leukämie	2000 (US)	
Campath: Alemtuzumab	CD52; humanisierter IgG1	Chronische lymphatische Leukämie	2001 (US)	2001 (EU)
Zevalin: Ibritumomab tiuxetan	CD20; muriner IgG1, Radioimmunkonjugat (Yttrium 90)	Non-Hodgkin-Lymphome	2002 (US)	2004 (EU)
Bexxar: Tositumomab-I-131	CD20; muriner IgG2a, Radioimmunkonjugat (Iodine 131)		2003 (US)	
Erbitux: Cetuximab	EGFR; chimärer IgG1	Metastasierende kolorektale Karzinome	2004 (US)	2004 (EU)
Avastin: Bevacizumab	VEGF; humanisierter IgG1		2004 (US)	2005 (EU)
Vectibix: Panitumumab	EGFR; humaner IgG2	kolorektale Karzinome	2006 (US)	
Arzerra: Ofatumumab	CD20; humaner IgG1	Chronische lymphatische Leukämie		2009 (EU)
Yervoy: Ipilimumab	CTLA-4; humane IgG1	Melanome	2011 (US)	
Adcetris: Brentuximab Vedotin	CD30; chimärer IgG1, Wirkstoffimmunkonjugat	Hodgkin-Lymphome und großzellig-anaplastisches Lymphom	2011 (US)	

* im Jahr 2010 wieder vom Markt genommen
(EGFR: *Epidermal Growth Factor Receptor*, VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*)

Der wohl bekannteste tumorspezifische Antikörper, der als erstes die klinischen Phasen mit Erfolg absolvierte, ist Rituximab. Er ist ein CD20-spezifischer, chimärer IgG1-Antikörper und

wird für die Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen eingesetzt. Durch seinen konstanten IgG1-Antikörperteil kann er als Effektorfunktion CDC und ADCC sowie durch Bindung des Antigens CD20 auch direkt Apoptose bei den Tumorzellen auslösen [47].

CDC

Die Komplement-abhängige Zytotoxizität (CDC) umfasst die Aktivierung des Komplementsystems durch die Bindung von monoklonalen Antikörpern an ein Oberflächenantigen von Zielzellen. Durch die Bildung von Antikörper-Antigen-Komplexen auf der Zelloberfläche wird die Aktivierung der klassischen Komplementkaskade über den Komplementfaktor C1q induziert. In deren Verlauf werden nach und nach die verschiedenen Plasmaproteine durch Proteolyse aktiviert, wodurch letztlich direkt eine Zellyse und dadurch bedingt der Zelltod ausgelöst wird [35, 47, 50, 51].

ADCC

Auch durch die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) werden Signalmechanismen an der Zielzelle ausgelöst, die letztlich zum Zelltod führen [47]. Die Zielzellen werden von IgG-Antikörpern an der Zelloberfläche gebunden. Die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) binden über ihren (CD16-) FcγRIIIa-Rezeptor spezifisch an die Fc-Teile der IgG-Moleküle auf den Zielzellen. Sie schütten mit Perforinen und Granzymen gefüllte Granula aus, welche Apoptose oder die direkte Lyse der Zielzelle herbeiführen [50-54]. Weiterhin sezernieren sie Interferon-gamma (IFN-γ) und aktivieren dadurch umliegende Makrophagen. Aufgrund der niedrigen Affinität des FcγRIIIa-Rezeptors zum Fc-Teil werden die NK-Zellen nur durch viele IgG-Moleküle aktiviert, die sich im Cluster auf den Zielzellen befinden [50]. In klinischen Studien wurden bereits einige tumorspezifische Antikörper erfolgreich untersucht, deren Wirkmechanismus durch NK-Zellen vermittelte ADCC beinhaltet. Dazu gehören die durch die FDA zugelassenen Antikörper Rituximab (anti-CD20), Cetuximab (anti-EGFR) und Trastuzumab (anti-HER2/neu) [52, 53].

Modulation von Signaltransduktionswegen

Weitere Wirkmöglichkeiten der Antikörper basieren auf der Modulation von Signaltransduktionswegen durch Antigenbindung und -quervernetzung. Dazu zählen z.B. die Störung der Angiogenese, die Blockade von tumorassoziierten Wachstumsfaktorrezeptoren oder von Zelladhäsionsmolekülen, um die Bildung von Metastasen zu verhindern [47, 51, 55].

Die Angiogenese hat einen großen Einfluss auf die Entstehung, das Wachstum und die Metastasenbildung von soliden Tumoren und hämatologischen Erkrankungen und wird vor allem durch den *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) vermittelt [55, 56]. Die Blockade der VEGF-Rezeptoren durch monoklonale Antikörper konnte in klinischen Studien das Tumorwachstum hemmen. Der von der FDA zugelassene Antikörper Bevacizumab wirkt

über diesen Mechanismus und wird für die Therapie von metastasierenden kolorektalen Karzinomen und anderen soliden Tumoren eingesetzt [55].

Die Aktivierung von Wachstumsfaktorrezeptoren führt normalerweise zur Anregung des Zellwachstums und gleichzeitig zur Inhibition der Apoptose. Auf Tumorzellen sind derartige Rezeptoren oft überexprimiert, so dass es zu einem unkontrollierten Wachstum des Tumors kommt. Die Bindung solcher Rezeptoren durch spezifische Antikörper kann deren Signalwege unterbrechen. Dies geschieht entweder dadurch, dass die Bindung des eigentlichen Liganden verhindert wird oder dass die Rezeptoren durch Aggregation blockiert werden [51, 57]. Der von der FDA zugelassene monoklonale Antikörper Trastuzumab (anti-HER2/neu) inhibiert die Dimerisierung des HER2-Rezeptors, welcher ein Mitglied der *Epidermal Growth Factor Receptor*- (EGFR-) Familie ist. Dadurch wird die Signalweiterleitung abgeschwächt, was die Proliferation der HER2⁺ Mammakarzinomzellen hemmt [51, 58].

Da die Inhibition eines einzelnen Signalweges wegen alternativer Wege der Zellen oft unzureichend ist, werden derartige Antikörper häufig in Kombination mit den gängigen Behandlungsmethoden wie Bestrahlung und Chemotherapie eingesetzt. Die antitumoralen Wirkmechanismen können sich dann ergänzen [47].

Antikörperkonjugate und -fusionen

Die Kopplung von Antikörpern mit Radioisotopen, Zytokinen, Enzymen, Wirkstoffen oder Toxinen kann die therapeutische Wirkung im Vergleich zu unkonjugierten Antikörpern verbessern und verstärken. Bei der Therapie von Non-Hodgkin-Lymphomen konnte für CD20-spezifische Radioimmunkonjugate gegenüber dem entsprechenden unkonjugierten Antikörper eine größere antitumorale Wirkung nachgewiesen werden. Auch andere Antikörperkonjugate bzw. -fusionen wurden in den letzten Jahren in klinischen Studien untersucht [47].

Der Antikörper und der Fusionspartner werden entweder chemisch konjugiert oder genetisch durch einen Peptidlinker fusioniert [46]. Entscheidend bei der Konstruktion der Antikörperkonjugate bzw. -fusionen ist die optimale Wahl des Antikörperformates, die sich je nach Anwendung unterscheidet. Kleine Formate mit molekularen Massen <50-60 kDa weisen eine verbesserte Penetration in solide Tumore auf und verteilen sich besser im gesamten Tumorgewebe. Da sie aber bedeutend schneller als z.B. ganze IgG-Antikörper über die Nieren ausgeschieden werden (renale *Clearance*), haben sie stark verminderte Serumhalbwertszeiten [4, 47, 59]. Eine molekulare Masse von 60-120 kDa ermöglicht eine Balance zwischen *Clearance*, Retention und Tumorpenetration. Neben der Größe sollten auch die Valenz und mögliche chemische Modifikationen für einen optimalen therapeutischen Nutzen angepasst werden [4].

Radioimmunkonjugate

Radioimmunkonjugate waren die ersten Antikörperkonjugate, die untersucht wurden. Sie kommen in bildgebenden Verfahren wie der Immunszintigraphie zur Tumordiagnose zum Einsatz, werden aber auch in der Radioimmuntherapie eingesetzt. Die Tumorzellen werden durch die spezifischen Antikörper gebunden und durch die radioaktive Strahlung des Radioisotops zerstört, wobei keine Internalisierung in die Zielzellen nötig ist [47]. Da die eingesetzten Radionukleotide unterschiedliche Eigenschaften hinsichtlich ihrer Halbwertszeiten und ihrer Reichweite haben, ist die Wahl des Therapeutikums von der Art und Größe des Tumors abhängig. α -Strahler haben eine kurze Reichweite und sehr energiereiche radioaktive Strahlung, während β -Strahler zwar eine größere Reichweite, aber energieärmere Strahlung aufweisen [47, 60]. Die Immunkonjugate werden intravenös verabreicht und verteilen sich über den Blutkreislauf. Dabei ist die vom Körper aufgenommene Strahlung niedriger als bei der konventionellen Bestrahlungstherapie, kann aber je nach Halbwertszeit des eingesetzten Radioisotops und der systemischen *Clearance* des verwendeten Antikörpers über einen längeren Zeitraum auf den Körper einwirken und dadurch einen vergleichbar hohen Effekt erzielen [47]. Patienten entwickeln aber oft Unverträglichkeiten, da das Konjugat unspezifisch in das Knochenmark aufgenommen wird [49].

Immunzytokine

Zytokine wie z.B. Interleukin-2 (IL2) werden bereits ohne Fusion an einen Antikörper für die Behandlung von Krebserkrankungen eingesetzt. So ist IL2 von der FDA für die Therapie von metastasierenden Melanomen zugelassen. Der Einsatz von IL2 ist aber mit massiven Nebenwirkungen verbunden [61, 62]. Es ist anzunehmen, dass die Fusion eines Antikörpers an Interleukine wegen der dadurch vermittelten Tumorspezifität sowohl die Wirksamkeit erhöht als auch die unspezifische Toxizität vermindert. Die Kombination von Herceptin mit Interleukin-12 (IL-12) bewirkte im Vergleich zum unkonjugierten Antikörper eine Verstärkung der durch NK-Zellen vermittelten Immunantwort auf HER2⁺ Tumorzellen im Mausmodell [52]. Die Immunzytokine werden genetisch generiert und vereinen Zellspezifität und Effektorfunktionen (CDC, ADCC) durch den Antikörper sowie die Aktivierung von B-/T-Zellen, natürlichen Killerzellen, Monozyten und Makrophagen durch das Zytokin [61, 63].

Antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT)

Fusionen aus Antikörpern und Enzymen werden in der sogenannten ADEPT eingesetzt. Diese Methode umfasst die Umsetzung einer inaktiven Medikamentenvorstufe (*Prodrug*) zum aktiven Medikament durch ein Enzym, das an einen spezifischen Antikörper fusioniert ist. Das Enzymimmunkonjugat wird intravenös verabreicht und gelangt über den Blutkreislauf zu den Tumorzellen. Da die Abgabe des *Prodrug* in das Blut zeitlich verzögert stattfindet, erfolgt die Aktivierung des Medikamentes erst nach der Bindung des Enzymimmun-

konjugates an den Zielzellen und nur am Ort des Tumors [4, 47]. Dennoch müssen ungebundene Enzymimmunkonjugate vorher entfernt werden, um eine systemische Umsetzung des Prodrugs durch im Blut verbliebende Konjugate zu verhindern [57]. Da die inaktive Vorstufe des Medikaments Zellmembranen nicht durchdringen kann, können nur Zelloberflächenantigene eingesetzt werden, die nach der Bindung des Enzymimmunkonjugates nicht oder nur sehr langsam internalisieren [4]. Obwohl die Methode in Tiermodellen erfolgreich war, mussten klinische Studien aufgrund einer zu schnellen systemischen *Clearance* und eines hohen immunogenen Charakters der nicht humanen Enzymkomponenten abgebrochen werden [47]. Weiterhin ist auch ein zytotoxischer Effekt auf gesundes umliegendes Gewebe (*Bystander*-Effekt) beobachtet worden [4], der bei heterogenen soliden Tumoren aber durchaus erwünscht sein kann.

Wirkstoffimmunkonjugate

Antikörper können mit Wirkstoffen wie z.B. Calicheamicinen, Maytansinoiden, Auristatinen oder neuen Taxoiden chemisch konjugiert werden [60, 64]. Die chemische Kopplung kann direkt oder über inerte Träger wie Dextran oder Aminosäurepolymere erfolgen und verändert die pharmakodynamischen Eigenschaften des Wirkstoffs. Dadurch können auch Stoffe eingesetzt werden, die ohne die durch den Antikörper bedingte Spezifität zu toxisch für den Körper wären. Das Verhältnis von Wirkstoff zu Antikörper muss genau ausbalanciert sein, um eine erfolgreiche Therapie zu gewährleisten. Der Einsatz derartiger Konjugate bietet sich besonders bei Leukämien an, da die erkrankten Zellen im Blut und Knochenmark von dem Therapeutikum sehr gut erreicht werden können [47]. Das Wirkstoffimmunkonjugat Gemtuzumab Ozogamicin (Mylotarg) gegen akute myeloide Leukämie ist von der FDA zugelassen, wies aber in späteren Studien ein ungünstiges Nutzen-Risiko-Verhältnis auf [60, 64] und wurde im Jahr 2010 wieder vom Markt genommen. Das CD30-spezifische Wirkstoffimmunkonjugat Brentuximab vedotin (Adcetris) mit dem antimitotischen Wirkstoff Monomethyl Auristatin E ist von der FDA zur Behandlung von Hodgkin- und einigen Non-Hodgkin-Lymphomen zugelassen (FDA, 2011).

Immuntoxine

In Immuntoxinen sind die Spezifität eines Antikörpers und die Wirkung eines meist natürlich vorkommenden starken Toxins miteinander kombiniert [4]. Zum Einsatz kommen bakterielle, pflanzliche oder fungale Toxine. Das Diphtherietoxin, das *Pseudomonas* Exotoxin A und das Anthraxtoxin sind die am häufigsten eingesetzten bakteriellen Toxine, während z.B. Ricin, Saporin und Gelonin oft eingesetzte Toxine pflanzlichen Ursprungs sind [4, 46, 60, 65]. Der natürliche Wirkmechanismus vieler dieser Toxine umfasst die Bindung an die Zelloberfläche durch eine spezielle Zellbindedomäne, die Internalisierung und anschließend die Translokation in das Zytoplasma der Zelle. Dort erfolgt die Hemmung der Proteinsynthese, was

zum Tod der Zelle führt [4, 49]. Für den Einsatz des Toxins in Immunkonjugaten muss die natürliche Zellbindedomäne entweder entfernt, chemisch inaktiviert oder mutiert werden, um eine rein Antikörper-vermittelte spezifische Bindung an die Zielzellen zu erreichen [4, 60].

Immuntoxine werden meist rekombinant in Bakterien wie *E. coli* produziert. Die Ausbeuten an funktionalem Konjugat sind oft sehr gering, da wegen der zytoplasmatischen Expression in *Inclusion Bodies* eine Rückfaltung und viele Reinigungsschritte nötig sind [4, 49, 65].

Trotz der vielversprechenden präklinischen Ergebnisse konnte der Erfolg zur Behandlung von soliden und hämatologischen Krebserkrankungen in klinischen Studien bisher nicht belegt werden. Neben dem starken immunogenen Charakter der nicht-humanen Toxine stellt auch die unspezifische Toxizität der Antikörper-Toxin-Fusionen ein ernstzunehmendes Problem dar, welches in klinischen Studien fatale Folgen hatte [4, 46]. Die Untersuchung eines Immuntoxins gegen B-Zell-Lymphome mit CD19- oder CD22-spezifischen Antikörpern und Ricin als toxischer Komponente belegte die unspezifische Bindung des Ricins an Endothelzellen [47]. Auch andere eingesetzte Toxine zeigen dieses Phänomen. Die Bindung an und der Durchtritt durch Endothelzellen kann zur Ausbildung des sogenannten *Vascular-Leak-Syndroms* führen, eine durch die Zunahme der Blutgefäßpermeabilität gekennzeichnete schwerwiegende Erkrankung, die tödliche Folgen haben kann [47, 65-67]. Um diese Probleme zu umgehen, wurden verschiedene Strategien untersucht. Neben der Gabe von Immunsuppressiva wurden die Immuntoxine modifiziert, um ihre Immunogenität herabzusetzen [46, 49, 65]. Da auch dadurch in Tiermodellen und klinischen Studien kein Erfolg verzeichnet werden konnte, rücken vollständig humane Immuntoxine immer mehr in den Fokus der Forschung. Eine vielversprechende Möglichkeit bietet der Einsatz humaner RNasen als „toxische“ Komponente [46].

1.3 ImmunRNasen

Ribonukleasen können als Toxine betrachtet werden, da sie aufgrund ihrer ribonukleolytischen Aktivität eine Inhibition der Proteinsynthese bewirken können [46]. Die meisten RNasen sind zwar weniger zytotoxisch als die bakteriellen und pflanzlichen Toxine, können aber nach Erreichen des Zytoplasmas einen vergleichbar starken Effekt haben [4]. Für einige RNasen konnte ein zytotoxischer Effekt bereits nachgewiesen werden. Dazu zählen die bakterielle Binase (*Bacillus intermedius*), das fungale α -Sarcin (*Aspergillus giganteus*), die bovine seminale RNase und die amphibische Onconase (*Rana pipiens*) [46]. Letztere wurde u.a. für die Behandlung von humanen Mesotheliomen untersucht und konnte bis jetzt als Einzige in klinischen Studien vielversprechende Ergebnisse liefern [4, 46, 60].

Im Vergleich zu den bakteriellen und pflanzlichen Toxinen werden die RNasen aus Wirbeltieren vom menschlichen Körper sehr gut toleriert. Die unspezifische Toxizität, die mit den gängigen Toxinen einhergeht, spielt bei RNasen keine Rolle, da sie weder unspezifisch noch über einen Oberflächenrezeptor an Zellen binden. Sie sind im extrazellulären Raum nicht toxisch, sondern entfalten ihre zytotoxische Wirkung erst nach Internalisierung in Zellen. Im menschlichen Körper kommen in fast allen Organen, Geweben und im Plasma RNasen vor, so dass eine Immunreaktion gegen diese RNasen ausgeschlossen werden kann [4]. Durch den Einsatz von humanen RNasen in Immuntoxinen könnte also auch das Problem der hohen Immunogenität der bakteriellen und pflanzlichen Toxine umgangen werden [4, 46].

Durch die Fusion eines Antikörpers an eine RNase kann eine gerichtete Toxizität erlangt werden, die durch die Spezifität des Antikörpers für ein bestimmtes Oberflächenantigen gegeben ist. Die zytotoxische Wirkung der ImmunRNase ist jedoch von vielen Faktoren abhängig. Neben dem Einfluss des verbindenden Linkers auf die Wirksamkeit stellen die einzelnen Schritte der Internalisierung limitierende Faktoren dar [4]. In Abbildung 1-9 ist schematisch der mögliche Ablauf nach der Zellbindung einer ImmunRNase dargestellt.

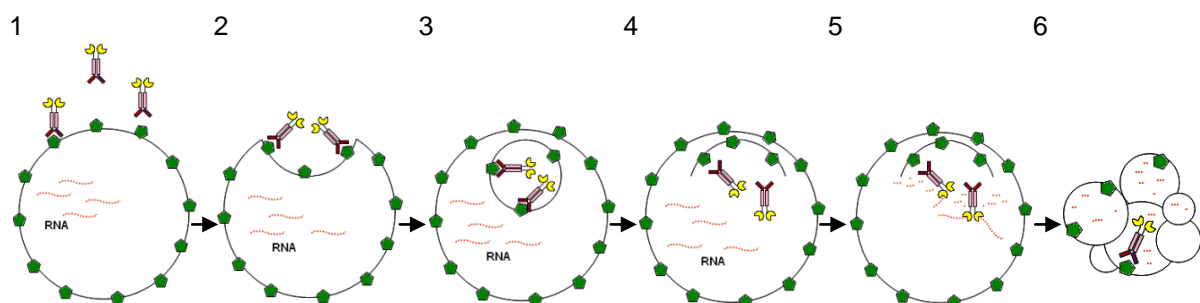


Abbildung 1-9: Schematischer Ablauf nach der Zellbindung einer ImmunRNase

Die Bindung der ImmunRNase an ein tumorassoziiertes Antigen auf der Zelloberfläche (1) löst die rezeptor-vermittelte Endozytose des ImmunRNase-Rezeptor-Komplexes aus (2). Der Komplex liegt in den Endosomen vor (3) und wird in das Zytoplasma freigesetzt (Translokation) (4), wo durch die Degradation der RNA durch die RNase (5) der Zelltod ausgelöst wird (6).

Nach der antikörpervermittelten Zellbindung wird der ImmunRNase-Antigen-Komplex durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen. Die ImmunRNasen müssen dem lysosomalen Abbau entkommen und stattdessen in das Zytoplasma freigesetzt werden (Translokation). Dort kann die zelluläre RNA durch die ribonukleolytische Aktivität der RNase zerstört und der Zelltod ausgelöst werden (Abbildung 1-9). Dies kann aber durch den RI verhindert werden, der in hohen Konzentrationen im Zytoplasma vorhanden ist [4].

Die ersten ImmunRNasen waren chemisch konjugierte Varianten gegen den Transferrin-Rezeptor (CD71) mit der bovinen RNase A als toxische Komponente. Die Nachteile der chemischen Konjugate wie Heterogenität und Unterschiede von Charge zu Charge können durch die genetische Konstruktion von Antikörper-RNase Fusionsproteinen mit Peptidlinkern umgangen werden [4, 67]. Neuere Ansätze beschäftigen sich vor allem mit ImmunRNasen, die aus vollständig humanen Komponenten bestehen [4].

1.4 Der Tumormarker CD30

Der Erfolg einer ImmunRNase im Hinblick auf ihre Spezifität und Zytotoxizität ist von dem Zielantigen abhängig. Das Antigen sollte nur auf Tumorzellen vorhanden sein und nach der Bindung der ImmunRNase internalisieren. Da solche tumorspezifischen Antigene selten sind [48], werden zur Vermeidung einer peripheren Toxizität tumorassoziierte Antigene gewählt, die auf der Oberfläche der Tumorzellen stark überexprimiert sind [46]. Ein solches Antigen stellt CD30 dar.

1.4.1 Eigenschaften des Tumormarkers CD30

Das Oberflächenantigen CD30, früher auch Ki-1 genannt, eignet sich als Zielantigen für eine Therapie mit Antikörpern oder ImmunRNase sehr gut, da eine hohe Expression des Antigens nur unter pathogenen Bedingungen stattfindet und es nur auf wenigen gesunden Zellen vorkommt [68, 69]. Die Überexpression ist ein Charakteristikum von Lymphomen und wenigen anderen Tumorerkrankungen [70, 71]. Eine nicht-tumorassoziierte Expression kann in aktivierten proliferierenden oder virusinfizierten Lymphozyten sowie in endometrialen, dezidualen Zellen und im parafollikulären Raum der Lymphknoten nachgewiesen werden. Weitere CD30-positive Zellen im menschlichen Körper sind nicht beschrieben [69, 71].

Die genetische Lokalisation auf dem Chromosom 1p36 und typische strukturelle Eigenschaften weisen CD30 als Mitglied der Tumor Nekrose Faktor Rezeptor (TNFR) Superfamilie aus [69]. Es handelt sich um ein Typ I-Transmembranprotein, dessen N-Terminus in den extrazellulären und C-Terminus in den intrazellulären Raum reicht. Der reife CD30-Rezeptor entsteht durch starke Glykosylierungen aus einem ~85 kDa großen Vorläuferprotein und hat eine molekulare Gesamtmasse von ~120 kDa. Es treten Glykosylierungen des Komplextyps und des O-verknüpften Typs auf. Der extrazelluläre Teil des CD30 ist homolog zu der TNFR Superfamilie und weist sechs Cystein-reiche Motive auf, die in der Mitte durch eine ~50 Aminosäure große, stark O-glykosylierte *Hinge*-Region unterbrochen werden (Abbildung 1-10). Die zytoplasmatische Region des CD30 hat hingegen keine Homologien zu den anderen Mitgliedern der Familie. Trotz potentieller Phosphorylierungsstellen fehlt die katalytische Kinaseaktivität, so dass von Unterschieden im Signalmechanismus ausgegangen wird [69, 71, 72].

Neben der membrangebundenen Form gibt es auch eine lösliche Variante, die sCD30 (engl. *soluble*) genannt wird. Sie besteht nur aus dem extrazellulären Teil des CD30, der durch eine proteolytische Spaltung (*Shedding*) abgetrennt wird [69, 71]. Erhöhte sCD30-Konzentrationen werden im Serum von Patienten mit viralen Infektionen (HIV, Hepatitis B Virus, EBV), einigen autoimmunen Erkrankungen und den oben erwähnten Tumorerkrankungen gefunden und können somit einen Hinweis auf die Erkrankung geben und eine Verlaufskontrolle ermöglichen [71].

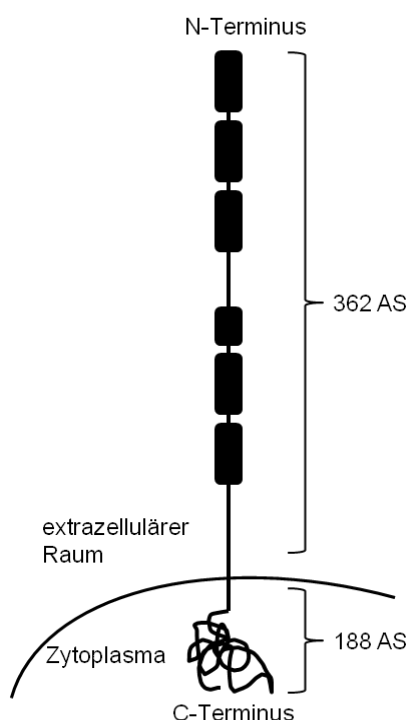


Abbildung 1-10: Schematischer Aufbau des humanen Tumormarkers CD30 (verändert nach [71])

Die biologische Funktion von CD30 ist stark von dem Zelltyp, dem Differenzierungsgrad und den umgebenden Stimuli abhängig. Der natürliche Ligand von CD30, CD30L, wird auf verschiedenen hämatopoetischen Zellen wie aktivierten T-Zellen, ruhenden B-Zellen und Granulozyten exprimiert [68]. Die Effekte nach der Bindung des Liganden CD30L oder CD30-spezifischer Antikörper sind pleiotrop und können Differenzierung, Aktivierung, Proliferation oder Zelltod umfassen [69, 71]. Der Mechanismus beinhaltet die für TNF-Rezeptoren charakteristische Trimerisierung des CD30-Antigens und die Aktivierung von NF- κ B, wodurch unterschiedliche Signalwege ausgelöst werden können [68, 70, 71, 73, 74].

Das Protein CD30 ist bereits in anderen Arbeiten als Zielantigen für Antikörper-basierte Therapien erforscht worden. Der murine monoklonale Antikörper BerH2 und bispezifische Varianten bzw. Toxin-Konjugate mit diesem Antikörper sind untersucht worden, erbrachten aber keinen Langzeiterfolg und lösten starke toxische Nebenwirkungen und Immunreaktionen aus [4]. Andere unkonjugierte Antikörper lieferten enttäuschende Ergebnisse in klinischen Studien, während die meisten Immunkonjugate durch starke Nebenwirkungen auffielen [75]. Das Wirkstoffimmunkonjugat Brentuximab vedotin (Adcetris) aus einem CD30-spezifischen Antikörper und dem antimitotischen Wirkstoff Monomethyl Auristatin E ist von der FDA zur Behandlung von Hodgkin- und einigen Non-Hodgkin-Lymphomen zugelassen (FDA, 2011). Neuere Ansätze richten sich auf den Einsatz rein humaner Immunkonjugate. Menzel *et al.* generierten ein vollständig humanes Fusionsprotein aus einem IgG-ähnlichen scFv-Fc Antikörper und der humanen RNase1, das einen wachstumshemmenden Einfluss auf CD30⁺ Zellen ausübte [76].

Die Tabelle 1-5 gibt einen Überblick über Antikörper und Antikörperkonjugate für die Therapie von CD30⁺ Hodgkin-Lymphomen.

Tabelle 1-5: Getestete Antikörper und -konjugate gegen CD30⁺ Hodgkin Lymphome (Stand 2010) [75]

Getesteter/s Antikörper(-konjugat)		Status
Monoklonaler Antikörper	MDX-060	Phase I/II abgeschlossen und aktiv
	SGN-30	
	MDX-1401	
	XmAb2513	
Immuntoxin	RicinA IT	
	Saporin IT	
	MMAE IT (SGN-35)*	
Radioimmunkonjugat	¹³¹ Iod-RIC	Phase I/II abgeschlossen
Bispezifischer Antikörper	HRS3-A9 (CD16)	
	H22xKi-4 (CD64)	

* im Jahr 2011 von der FDA für die Behandlung von Hodgkin- und einigen Non-Hodgkin-Lymphomen zugelassen

1.4.2 CD30⁺ Erkrankungen

Lymphome sind Tumore der lymphatischen Organe wie Lymphknoten, Milz und B- bzw. T-Lymphozyten. Die verschiedenen Formen werden in die Hodgkin-Lymphome (HL) und Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) eingeteilt [77]. Das Oberflächenantigen CD30 ist auf den Zellen der HL sowie einiger hochmaligner Formen der NHL wie z.B. dem großzellig-anaplastischen Lymphom (ALCL, engl. *anaplastic large cell lymphoma*) stark überexprimiert [70, 71]. Weiterhin wird eine vermehrte CD30-Expression bei embryonalen Hoden- und Bindegewebstumoren detektiert [69, 71].

Hodgkin-Lymphome (HL)

Das Hodgkin-Lymphom (HL) wurde erstmals im Jahr 1832 von Dr. Thomas Hodgkin beschrieben und nach ihm benannt. Es handelt sich mit 2-3 Neuerkrankungen auf 100.000 Personen pro Jahr um eine relativ seltene Erkrankung, die bevorzugt Männer zwischen dem 20. und 30. sowie nach dem 65. Lebensjahr betrifft [77]. Das HL ist aber eines der am häufigsten auftretenden Lymphome [78]. Es äußert sich durch schmerzlose Schwellungen der Lymphknoten meist am Hals oder hinter dem Brustbein. Weiterhin können allgemeine Krankheitssymptome wie Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust, Infektanfälligkeit oder Abgeschlagenheit auftreten. Bei fortgeschrittener Erkrankung können auch weitere Organe wie Knochen und Leber befallen sein [77].

Ein charakteristisches histologisches Merkmal des HL sind die Hodgkin Reed-Sternberg-Zellen (H-RS-Zellen), die durch ihre enorme Größe und mehrere Kerne auffallen. Ihr Vorhandensein unterscheidet die HL von der großen Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome [77]. Die malignen, multinuklearen H-RS-Zellen sind mit <1 % in der Minderheit und bilden zusammen mit den mononuklearen HL-Zellen das HL. Sie sind durch somatische Hypermutationen und eine Umgestaltung der Immunglobulingene (V_H) aus einer B-Lymphozytenzelle entstanden [78-80]. Die H-RS-Zellen weisen keine Ig-Gentranskripte und keine

B-Zell-spezifischen Oberflächenantigene wie CD19, CD20 oder CD79a mehr auf, exprimieren aber CD30 in hohem Maß [79]. Eine maligne H-RS-Zelle kann von bis zu 1000 benignen Zellen umgeben sein [80], die T- und B-Lymphozyten, Neutrophile, Makrophagen und eosinophile Granulozyten umfassen [68, 77, 78].

Nach der WHO-Klassifikation (engl. *World Health Organization*) werden die HL aufgrund ihrer Unterschiede in der Histologie und der Morphologie der H-RS-Zellen sowie des Immunphänotyps in zwei Gruppen eingeteilt. Der kleinere Anteil (~5 %) wird dem nodulären lymphozyten-prädominanten HL zugeordnet. Die restlichen ~95 % gehören der Gruppe des klassischen HL an, die nochmals in vier histologische Subtypen unterteilt wird. Dazu zählen der nodulär-sklerosierende Typ, der mit ~65 % der Fälle den größten Anteil ausmacht sowie der Mischtyp (~25 %), das lymphozytenreiche klassische HL (~4 %) und das lymphozyten-arme klassische HL (1 %) [77, 78].

Neben der Entartung der B-Lymphozyten, die zur Entstehung der H-RS-Zellen führt, kommen weitere Ursachen und Auslöser des HL in Frage [77]. Da in den H-RS-Zellen vieler HL der Epstein-Barr-Virus (EBV) genetisch nachgewiesen werden kann, wird eine Beteiligung der Virusinfektion an der Entstehung des HL diskutiert [77, 80]. Die Infektion mit dem EBV kann im Menschen das Pfeiffer'sche Drüsenfieber auslösen und es konnte bewiesen werden, dass Menschen nach dem Durchleiden dieser Erkrankung gehäuft ein HL entwickeln [77]. Das genetische EBV-Material kann aber nicht in allen HL-Fällen detektiert werden und die meisten Menschen infizieren sich bis zum 30. Lebensjahr mit dem EBV ohne jemals ein HL zu entwickeln, so dass keine direkte pathogene Beziehung zwischen dem EBV und dem HL erwiesen ist. Als weitere die Krankheit begünstigende Faktoren werden neben Umwelteinflüssen auch genetische Ursachen diskutiert, da das HL manchmal gehäuft in Familien auftritt [77, 80]. Ein spezifisches Gen konnte bis jetzt aber nicht identifiziert werden [80].

Non-Hodgkin-Lymphome (NHL)

Die heterogene Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) beinhaltet alle malignen Lymphome, die keine HL sind. Die verschiedenen NHL unterscheiden sich in ihrer Histologie und ihrem Krankheitsverlauf sehr stark. In Deutschland gibt es 10-15 Neuerkrankungen auf 100.000 Personen pro Jahr, wobei die Zahl in den letzten Jahrzehnten stetig gestiegen ist. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines NHL ist bei Männern größer und steigt mit dem Alter, so dass als Auslöser u.a. von alterungsbedingten chromosomalen Mutationen ausgegangen wird. Als weitere die Krankheit begünstigende Faktoren werden ein geschwächtes Immunsystem, durchlittene virale und bakterielle Infektionen, eine genetische Prädisposition, autoimmune Reaktionen sowie schädliche Umwelteinflüsse diskutiert. Die auftretenden Symptome sind denen des HL ähnlich und umfassen in erster Linie schmerzlose Lymphknotenschwellungen und allgemeine Krankheitszeichen wie Abgeschlagenheit und

Infektanfälligkeit. Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsabnahme und durch den Befall von Organen ausgelöste Beschwerden wie Anämie sind auch zu beobachten [77].

Die NHL werden abhängig von ihrer Malignität, Ausbreitungsart und Wachstumsgeschwindigkeit in niedrigmaligne, zytische (~70 %) und hochmaligne, blastische (~30 %) Formen eingeteilt. Beide Tumorgruppen entstehen häufiger aus B- statt aus T-Lymphozyten. Bei den niedrigmalignen Formen handelt es sich meist um chronische Erkrankungen, die durch eine Behandlung gut kontrolliert werden können. Die hochmalignen Formen weisen eine rasche Verlaufsform auf und müssen schnell und intensiv behandelt werden. Die Gruppe umfasst das Burkitt-Lymphom, das Mantelzell-Lymphom und das diffus großzellige B-Zell-Lymphom. Zu Letzterem gehören die immunoblastischen, T-Zell-reichen und die großzellig-anaplastischen B-Zell-Lymphome, die ~80-90 % aller hochmalignen Lymphome ausmachen [77]. Das T-Zell-basierte großzellig-anaplastische Lymphom (ALCL) weist eine starke Überexpression des Oberflächenantigens CD30 auf [70-72, 81].

Andere CD30⁺ Tumore

Die adulte T-Zell-Leukämie (ATL) zählt zu den chronischen CD4⁺-Leukämien und wird durch das humane T-lymphotrope Virus Typ 1 induziert. Die Krankheit verläuft sehr aggressiv und ist resistent gegenüber Chemotherapie, so dass die meisten Patienten innerhalb von einem Jahr versterben. Die Zellen der ATL weisen eine Überexpression des Oberflächenantigens CD30 auf [82].

In den Zellen von embryonalen Karzinomen des Hodens konnte ebenfalls eine Expression von CD30 nachgewiesen werden, während gesunde adulte, neonatale und fötale Hoden sowie andere fötale Gewebe und die Plazenta keine CD30-Expression aufwiesen [83]. In einigen nichtembryonalen Karzinomen, malignen Melanomen sowie einigen benignen und malignen mesenchymalen Tumoren konnten ebenfalls CD30-Expressionen detektiert werden [84].

Therapie der HL und NHL

Die gängige Behandlung von HL umfasst Chemotherapie und Bestrahlung. Da die Zellen der HL auf beide Therapieformen sehr empfindlich reagieren [77], können dadurch ~90 % der Patienten geheilt werden [78]. Die Art der Chemotherapie sowie die Anzahl der Zyklen und die Entscheidung über eine nachfolgende Bestrahlungstherapie hängen von dem Stadium des Lymphoms ab, das die Ausbreitung und mögliche zusätzliche Allgemeinsymptome beschreibt. Nach der Ann-Arbor-Klassifikation werden vier Stadien der Erkrankung unterschieden, die von einem lokalen, klar abgegrenzten Befall eines lymphatischen Organs (Stadium I) bis zu einem diffusen Befall extralymphatischer Organe (Stadium IV) reichen [77]. Die restlichen ~10 % der Patienten sprechen auf die gängigen Behandlungen nicht an, außerdem ist die Rückfallquote mit 20-30 % sehr hoch [68, 78].

Für die hochmalignen NHL gibt es keine einheitliche Behandlungsstrategie, sie werden je nach Art unterschiedlich behandelt. Dabei spielt die Histologie und das Stadium (s.o.) des Lymphoms eine Rolle. In frühen Stadien können dabei nahezu alle, in späteren Stadien immerhin ~60 % der Patienten geheilt werden. Neben Strahlen- und Chemotherapie und Stammzelltransplantation werden auch Radioimmun- und Antikörpertherapien (z.B. Rituximab, CD20-spezifisch) eingesetzt [77].

Die akuten Nebenwirkungen der Chemo- und Strahlentherapie umfassen oft eine Schädigung des Knochenmarks und eine dadurch gestörte Blutbildung. Weiterhin treten in vielen Fällen Unfruchtbarkeit oder eine Beeinträchtigung der Herz- und Lungenfunktion oder Entzündungen dieser Organe auf [77]. Neben den akuten Nebenwirkungen entwickeln viele Patienten als Spätfolge Sekundärtumore (NHL, Leukämien, solide Tumore). Um die Behandlung in Zukunft weiter optimieren zu können, werden neue Therapieformen erforscht [68, 77, 78].

2 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Doktorarbeit ist die Generierung von humanen Antikörpern und Antikörper-RNase Fusionsproteinen (ImmunRNasen) zur Bekämpfung von CD30⁺ Lymphomen.

Dazu sollen zunächst die acht ribonukleolytisch aktiven Mitglieder der humanen RNase A Superfamilie produziert und gereinigt werden. Durch Bestimmung ihrer ribonukleolytischen Aktivitäten und der Inhibition dieser durch den humanen RI soll ihre Eignung als toxische Komponente in ImmunRNasen analysiert und verglichen werden.

Weiterhin sollen vier neue CD30-spezifische Antikörper in verschiedenen Formaten (scFv-Fragment und scFv-Fc Antikörper) in *E. coli* bzw. Säugerzellen (HEK293 T Zellen bzw. HEK293 6E Zellen) produziert und gereinigt werden. Anschließend soll die eingehende Charakterisierung der Antikörper bezüglich der Konformation, Affinität, Sensitivität und Spezifität erfolgen und entschieden werden, welcher Antikörper als Zellbindedomäne in den ImmunRNasen eingesetzt wird.

Die ImmunRNasen sollen anschließend als dimere scFv-Fc-RNase Fusionsproteine mit verschiedenen Linkern kloniert, produziert und gereinigt werden. Sie sollen hinsichtlich ihrer Konformation und Spezifität charakterisiert werden. Weiterhin sollen Untersuchungen zur Internalisierung der ImmunRNasen in CD30⁺ Lymphomzellen erfolgen. Der Einfluss der ImmunRNasen auf das Wachstum und die Viabilität von CD30⁺ Lymphomzellen soll analysiert und die Wirkweise geklärt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Tabelle 3-1: Verwendete Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Chromatographieanlage	Äkta purifier	GE Healthcare, München
	Äkta prime	GE Healthcare, München
	Profinia Purification	Bio-Rad, Hercules (USA)
Blot-Apparaturen	Blot-Apparatur Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, München
	Multiscreenkammer MiniProteanIII	Bio-Rad, München
Durchflusszytometer	Cytomics FC 500	Beckman Coulter, Brea (USA)
Elektrophorese-Apparaturen	Biotech. Model 40-0708/40-2314	peqlab Biotech. GmbH, München
	Mini Protean III	Bio-Rad, München
ELISA-Apparaturen	Reader Tecan SUNRISE	Tecan, Crailsheim
	Washer Columbus pro - Basic	Tecan, Crailsheim
Filtrationseinheit	Nalge	Nunc, Wiesbaden
Fluoreszenzmikroskop mit Zubehör	Controller C4742-95	Hamamatsu, Herrsching
	Digitaalkamera C4742-95	Hamamatsu, Herrsching
	Lampe ebx 75 isolated	Leistungselektronik GmbH, Jena
	Mikroskop Axiovert 200	Zeiss, Jena
Geldokumentation	Geldokumentation	Intas, Göttingen
Inkubatoren	BE400	Memmert Omnilab, Schwabach
	HeraCell (CO ₂ -begast)	Kendro Lab. Products, Hanau
	HT Minitron (CO ₂ -begast)	Infors AG, Bottmingen
	Schüttelschrank HT	Infors AG, Bottmingen
	Thermomixer <i>comfort / compact / 5436</i>	Eppendorf, Hamburg
Laserscanning Mikroskop	LSM 510 META	Zeiss, Jena
Lichtmikroskop	Leitz Diavert	Leitz, Wetzlar
Mikrotiterplatten Reader	Multiscan Spectrum Reader	Thermo Electron Corp., Erlangen
	Tecan Ultra Reader	Tecan, Crailsheim
Netzgeräte	EPS 301 / 601	Amersham Pharmacia, München
PCR-Gerät	Thermocycler DNA-Engine	Bio-Rad, München
pH-Meter	CG810	Schott, Mainz
Photometer	Libra S11	biochrom, Berlin
	NanoDrop ND-1000	peqlab Biotech. GmbH, Erlangen
Pipetten	Biohit e1200	Biohit, Helsinki
Pipettierhilfe	Accu-jet	Brand, Wertheim
Reinstwasseranlage	arium 611	Sartorius, Göttingen
Rotoren	GS3	Kendro Lab. Products, Hanau
	SLA-3000 Super Lite	Kendro Lab. Products, Hanau
	SS34	Kendro Lab. Products, Hanau
Schüttler und Wippen	Überkopfschüttler CMV 3100	Labortech. Fröbel GmbH, Lindau
	Rotierapparat RA20	Gerhardt, Königswinter
	Rotierheizblock	IKAMAG RCT, Staufen
	Thermoshaker PST-60HL-4	lab4you, Berlin
	Wippe GFL 3013	Omnilab Laborzentrum, Bremen
SPR-Messgerät	Biacore 2000	GE Lifescience, München

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Sterilbänke	HeraSafe LaminAir HLB 2472 MSC-Advantage	Heraeus Instr., Braunschweig Heraeus, Braunschweig Thermo Scientific, Braunschweig
Vakuumpumpe	Vakuumpumpe	KNF Laboport, New Jersey
Vortexer	Vortex genie 2	Scientific Industries, New York
Waagen	1203 MP Analytic A 120 S EMB 220-1	Sartorius, Göttingen Sartorius, Göttingen Kern, Balingen-Frommen
Wasserbad	Wasserbad GFL	Laborbedarf, Braunschweig
Zentrifugen	Eppendorf 5810R Eppendorf 5415D Heraeus Instruments Biofuge Pico Sorval RC5B Plus Sorval RC5 Superspeed Sorval RC6 Plus	Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Kendro, Haunau Kendro, Haunau Kendro, Haunau Thermo Electron Corp., Erlangen

3.1.2 Computerprogramme und Datenbanken

Tabelle 3-2: Verwendete Computerprogramme und Datenbanken

Bezeichnung	Anwendung	Referenz
BIAevaluation 4.1	Auswertung der Biacore-Ergebnisse	Biacore
C-Design 3.0	Zeichnen von chem. Formeln	TU München (www.ch.tum.de/oc1/EFontain/C-Design/)
ClustalW2	Abgleich mehrerer Sequenzen mit hierarchischem Aufbau	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/
CXP Analysis 2.2	Auswertung Durchflusszytometrie	Beckman Coulter
EMBOSS Transeq	Übersetzung von Nukleinsäuresequenzen in die entsprechenden Peptidsequenzen	http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/transeq/index.html
Endnote 9	Verwaltung von Literatur	Thomson Reuters
ExPASy ProtParam	Ermittlung von pI-Werten, Vorhersage von Signalsequenzen	Gasteiger <i>et al.</i> , 2005 [31]
Finch TV 1.4.0	Darstellung von Sequenzierdaten	Geospiza Inc., USA
Flowjo	Auswertung Durchflusszytometrie	Treestar
Gimp 2.6.8	Bildbearbeitung	http://www.gimp.org/
ImageJ 1.37	Quantifizierung von Proteinen, Bildbearbeitung	Nat. Institutes of Health
MultAlin	Abgleich mehrerer Sequenzen mit hierarchischem Aufbau	http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html (Corpet, 1988)
NCBI	Datenbank für Gen- und Proteinsequenzen, Literaturdatenbank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
NetNGlyc 1.0 Server	Vorhersage von N-Glycosylierungsstellen in humanen Proteinen	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/
OpenOffice 3.1	Protokolle, Zeichnungen, Berechnungen, Präsentationen	http://www.openoffice.org/
QtiPlot 0.9.3	Analyse und Visualisierung von Daten	http://soft.proindependent.com/qtiplot.html
SIB BLAST Network Service	Blasen von Proteinsequenzen	http://www.expasy.ch/tools/blast/
LSM 510 META Rel. Vers. 4.2 SP1	Steuerung des Laserscanningmikroskops	Zeiss
Unicorn 5.10	Auswertung Chromatographie	GE Healthcare
Vector NTI Advance 10.3	Erstellen von Vektorkarten	InforMax Inc., USA

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3-3: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Chelating Sepharose Fast Flow	GE Healthcare, München
CM5-Chip (Biacore)	GE Healthcare, München
Combitips plus (1 mL)	Eppendorf, Hamburg
Cryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Deckgläschen 15 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
Dialyseschläuche MWCO 6-8 kDa, 12-14 kDa	Carl Roth, Karlsruhe
Erlenmeyerkolben (Einweg)	Corning, New York (USA)
Filter Celluloseacetat 0,2 / 0,45 / 0,8 µm	Sartorius Stedim Biotech, Melsungen
Filter Minisart 0,2 / 0,45 µm	Sartorius Stedim Biotech, Melsungen
Filter Prefilter Glasfibre	Sartorius Stedim Biotech, Melsungen
Filterpapier (3 mm)	BioRad, Hercules (USA)
Gelblotting-Papier GB 002	Schleicher-Schuell, Dassel
Kanülen	B. Braun, Melsungen
Kulturplatte 7 cm	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Kulturplatte Zellkultur 100x20 mm	SPL Life science, Gyeonggi-Do (Korea)
Kulturplatte Zellkultur 6 well	SPL Life science, Gyeonggi-Do (Korea)
Küvetten (Einweg)	Brand, Wertheim
Mikro-Schraubröhre 2 mL PP	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotiterplatte MaxiSorp 96 well	Nunc, Roskilde (DK)
Mikrotiterplatte schwarz 96 well	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Mikrotiterplatte Suspensionszellen 96 well	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Objektträger 76x16 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm	American National Can, Chicago
PCR-Reaktionsgefäß	Sarstedt, Nümbrecht
Pipetten (Einweg, serologisch) 2 / 5 / 10 / 25 mL	Corning, New York (USA)
Pipettenspitzen (mit / ohne Filter)	Sarstedt, Nümbrecht; Greiner Bio-one, Frickenhausen
Polypropylenröhrchen 15 / 50 mL	Corning, New York (USA)
Probengefäße, Glas (Biacore)	Chromacol LTD, Hertfordshire (UK)
Probengefäße, PP (Biacore)	Gilson, Middleton (USA)
PS-Abdeckplatte	Greiner Bio-one, Frickenhausen
PVDF-Membran T830.1	Carl Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäß 1,5 / 2 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Röhre 5 mL (Durchflusszytometrie)	Sarstedt, Nümbrecht
Spatel (Einweg), steril	VWR, Darmstadt
Spritzen Braun Injekt 1 / 2 / 5 / 10 / 20 mL	B. Braun, Melsungen

3.1.4 Kits und Säulen

Tabelle 3-4: Verwendete kommerzielle Kits und Säulen

Kit / Säule	Hersteller
Bio-Scale™ Mini Bio-Gel P-6 Desalting Cartridge	Bio-Rad, München
Bio-Scale™ Mini UNOsphere Supra Cartridge	Bio-Rad, München
HiTrap™ rProtein A Fast Flow	Amersham biosciences, Freiburg
HiTrap™ SP Fast Flow	Amersham biosciences, Freiburg
MabSelect SuRe	Amersham biosciences, Freiburg
NucleoBond Xtra Midi	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel, Düren
Nucleospin Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
ZR Plasmid Miniprep™ - classic	Zymo Research, Irvine (USA)

3.1.5 Enzyme und zugehörige Puffer

Tabelle 3-5: Enzyme und zugehörige Puffer

Enzym / Puffer	Hersteller
BSA analytisch	New England BioLabs (NEB), Frankfurt
CIP	New England BioLabs (NEB), Frankfurt
Phusion DNA-Polymerase	Finnzymes, Keilaranta
Phusion-Puffer HF 5x	Finnzymes, Keilaranta
RedTaq DNA-Polymerase	Sigma, St. Louis
RedTaq-Puffer 10x	Sigma, St. Louis
Restriktionsendonucleasen BamHI, BglII, NcoI, NheI, NotI, PaeI, SpeI, XbaI	New England BioLabs (NEB), Frankfurt
Restriktions-Puffer NEB 1-4	New England BioLabs (NEB), Frankfurt
T4 DNA-Ligase	Promega, Mannheim
T4 DNA-Ligase-Puffer	Promega, Mannheim
TEV-Protease	Xenia Wezler

3.1.6 Antiseren und kommerzielle Antikörper

Tabelle 3-6: Verwendete Antiseren und kommerzielle Antikörper

Antikörper / Serum		Verdünnungen			Hersteller
		ELISA	IWB	FACS	
Kaninchen Serum anti-humane-RNase1, affinitätsgereinigt	67-3-4A		1:1000		Pineda, Berlin
Maus anti-C-Myc-tag	9E10/21	1:1000	1:500		AG Dübel
Ziege anti-Human IgG (Fc-spez.), AP	109-055-098		1:5000		Dianova, Hamburg
Ziege anti-Human IgG (Fc-spez.), FITC	105-095-098			1:100	
Ziege anti-Human IgG (Fc-spez.), HRP	A0170	1:80000			Sigma, St. Louis
Ziege anti-Kaninchen IgG, AP	A3687		1:20000		
Ziege anti-Maus IgG (Fc-spez.), HRP	A0168	1:50000	1:20000		

3.1.7 Chemikalien, Lösungen und Puffer

Die verwendeten Chemikalien entsprachen dem Reinheitsgrad p.a. und wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Fermentas (St. Leon Rot), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Carl Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Fluka, Riedel-de Haen) bezogen.

Tabelle 3-7: Verwendete Chemikalien, Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Komponente	Konzentration
Allgemeines		
PBS	NaCl Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	2,9 M 150 mM 50 mM
Glycerin	Glycerin steril	87 % (v/v)
Tween 20	Tween 20 (Fluka)	0,05 - 0,1% (v/v)

Bezeichnung	Komponente	Konzentration
Affinitätschromatographie (IEC, ÄKTA prime)		
Elutionspuffer pH 7,0	NaCl Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	0,5 M 50 mM 50 mM
Lagerungspuffer	Ethanol NaAc	20 % (v/v) 0,2 M
Waschpuffer pH 7,0	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	50 mM 50 mM
Affinitätschromatographie (IMAC, Batchverfahren)		
Bindungspuffer pH 7,4	Na ₂ HPO ₄ NaH ₂ PO ₄ NaCl Imidazol	20 mM 20 mM 0,5 M 10 mM
Elutionspuffer	EDTA in PBS	100 mM
NaCl-Lösung	NaCl	5 M
Nickellösung	NiSO ₄	100 mM
Waschpuffer	Na ₂ HPO ₄ NaH ₂ PO ₄ NaCl Imidazol	20 mM 20 mM 0,5 M 30 mM
Affinitätschromatographie (Protein A, ÄKTA prime)		
Elutionspuffer pH 3,0 (human) bzw. pH 5,0 (murin)	Tri-Natriumcitrat	100 mM
Bindepuffer pH 7,2 (human)	Na ₂ HPO ₄ NaH ₂ PO ₄	20 mM 20 mM
Bindepuffer pH 8,9 (murin)	Glycin NaCl	1,5 M 3 M
Neutralisierungspuffer pH 9,0	Tris HCl	1 M
Affinitätschromatographie (Protein A, Profinia)		
5x Binde- / Entsalzungspuffer pH 7,0	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ HPO ₄	685 mM 13,5 mM 21,5 mM 40,5 mM
5x Elutionspuffer pH 3,0	Natriumcitrat NaCl	500 mM 1 M
2x Cleaning-Lösung 1 pH 8,0	Tris NaCl	100 mM 2 M
4x Cleaning-Lösung 2 pH 4,5	CH ₃ COONa	400 mM
2x Lagerungslösung (Entsalzungssäule)	Benzylalkohol	4 % (v/v)
1x Lagerungslösung (Protein A Säule)	Ethanol	20 % (v/v)
Agarose-Gelelektrophorese		
Agarose	Agarose	0,7-2 % (w/v)
Ethidiumbromidlösung	Ethidiumbromid	25 mM
Ladepuffer	Fermentas	6x
Laufpuffer TAE pH 8,0	Tris HCl Essigsäure EDTA	4 mM 2 mM 1 mM
Durchflusszytometrie		
Puffer	EDTA FCS PBS	2 mM 2 % (v/v) 1x

Bezeichnung	Komponente	Konzentration
Coomassie-Färbung		
Entfärbelösung	Essigsäure	10 % (v/v)
Färbelösung	Coomassie Brilliant Blue G250	0,05 % (w/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
	Isopropanol	25 % (v/v)
ELISA		
Blocklösung	Milchpulver in PBST	2 % (w/v)
BSA	BSA (Serva)	-
Entwicklerlösung (TMB Reagenz)	Lösung A	95 % (v/v)
	Lösung B	5 % (v/v)
Lösung A pH 4,1	Tri-Kaliumcitrat	30 mM
	Zitronensäure	50 mM
Lösung B	TMB	1 mM
	Aceton	10 % (v/v)
	Ethanol	90 % (v/v)
	H ₂ O ₂	0,3 % (v/v)
PBS	PBS	1x
PBST	Tween 20 in PBS	0,1 % (v/v)
Stopplösung	H ₂ SO ₄	1 N
Waschpuffer	Tween 20 in PBS	0,05 % (v/v)
Expression und Reinigung von Proteinen		
PE-Puffer pH 8,0	EDTA	1 mM
	Saccharose	20 % (w/v)
	Tris HCl	50 mM
Größenausschlusschromatographie		
Laufpuffer	PBS	1x
Lagerungspuffer	Ethanol	20 % (v/v)
Immunfärbung (AP-konj.)		
BCIP-Lösung	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat	1,5 % (w/v)
	Dimethylformamid	100 % (v/v)
Blocklösung	Milchpulver in PBST	2 % (w/v)
NBT-Lösung	Dimethylformamid	70 % (w/v)
	NBT	3,0 % (w/v)
Substratpuffer pH 9,5	Tris HCl	100 mM
	MgCl ₂	0,5 mM
Waschpuffer	Tween 20 in PBS	0,1 % (v/v)
Fluoreszenzmikroskopie		
Immersionsöl	Immerso TM 518 F (Zeiss)	-
Mowiol/Dabco	Mowiol / Dabco	100 % / 0,1 %
Poly-L-Lysin	Poly-L-Lysin P4707 (Sigma)	0,01 %
Waschpuffer	PBS	1x
Oberflächenplasmonenresonanz		
EDC	EDC	0,5 M
Ethanolamin-HCl pH 8,5	Ethanolamin-HCl	1 M
Glycin-Lösung pH 2,5 - 3,0	Glycin	10 mM
NaOH-Lösung	NaOH	50 mM
Natrium-Acetat-Lösung pH 3,5 - 7,0	NaAc	10 mM
NHS	NHS	0,1 M
Puffer	PBS	1x
	Tween 20 peroxidfrei (Roth)	0,01 %
PCR		
dNTPs	dNTPs (Fermentas)	10 mM

Bezeichnung	Komponente	Konzentration
RNaseaktivitätstest / -inhibitionstest		
MES-Puffer pH 6,0	MES NaCl	100 mM 100 mM
RNase-Inhibitor RNasin	RNasin® (Promega)	variabel
Substrat	6-FAM-dA-rC/rU-dAdA-6-BHQ1	5 nM
SDS-PAGE		
Acrylamidmix	Acrylamid Bisacrylamid	30 % (w/v) 0,8 % (w/v)
APS-Lösung	APS	10 % (w/v)
Laemmli-Puffer (5x) mit/ohne β -Merkaptoethanol	(β -Merkaptoethanol) Bromphenolblau Glycerin SDS	15 % (v/v) 0,02 % (w/v) 50 % (v/v) 10 % (w/v)
Laufpuffer mit SDS pH 8,3	Glycin SDS Tris HCl	192 mM 0,1 % (w/v) 25 mM
SDS-Lösung	SDS	10 % (w/v)
Tris HCl-Lösung pH 6,8	Tris HCl	1 M
Tris HCl-Lösung pH 8,8	Tris HCl	1,5 M
Silberfärbung		
Fixiererpflösung	Stopplösung 37 % (v/v) Formaldehyd	99,95 % (v/v) 0,05 % (v/v)
Ethanol	Ethanol	50 % (v/v)
Natriumthiosulfatlösung	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$	20 % (w/v)
Silberlösung	20 % (w/v) AgNO_3 37 % (v/v) Formaldehyd	1 % (v/v) 0,075 % (v/v)
Entwicklerlösung	Na_2CO_3 37 % (v/v) Formaldehyd Natriumthiosulfatlösung	6 % (w/v) 0,05 % (v/v) 2 % (v/v)
Stopplösung	Methanol Essigsäure	50 % (v/v) 12 % (v/v)
Viabilitätstest		
MTT-Lösung	MTT PBS	5 mg/mL 1x
Stopplösung	HCl Isopropanol	0,04 N 100 % (v/v)
Western Blot		
Laufpuffer pH 8,3	Glycin Tris HCl	192 mM 25 mM
Zellkultur		
DSMO	Dimethylsulfoxid	100 %
Trypanblau	PBS Trypanblau	1x 0,4 % (w/v)
Trypsin/EDTA	Trypsin/EDTA (PAA, Austria)	-

3.1.8 Mikroorganismen und Zelllinien

Tabelle 3-8: Verwendete Mikroorganismen und Zelllinien

Mikroorganismus/ Zelllinie	Eigenschaften / Kultivierung	Herkunft/ Referenz	eingesetzt für
<i>E. coli</i> BLR (DE3)	F- <i>ompT hsdS_B (r-B_m-B_B) gal dcm (srl-rec)306::Tn10(Tc^R)</i> (DE3)	Novagen	Expression von TEV-Protease
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF'	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac-F' [proAB + lac^q ZDM15 TN10(tet^R)]</i>	Stratagene	Klonierung, Expression von scFv-Fragmenten
HD-MY-Z (ACC 346)	humane Hodgkin-Lymphom Zelllinie, in Suspension wachsend, CD30 ⁺	DSMZ	Bindung an natives Antigen
HEK293 6E	humane embryonale Nierenzelllinie, Expression von Epstein-Barr-Virus-Nukleares-Antigen1	NRC, BRI, Montreal, Canada	Expression von scFv-Fc Antikörpern und scFv-Fc-RNasen
HEK293 T (ATCC CRL-11268)	Humane embryonale Nierenzellen, adhären wachsend, transformiert mit SV40 Large-T-Antigen	Sena-Esteves <i>et al.</i> , 1999	Expression von scFv-Fc Antikörpern, scFv-Fc-RNasen und Antigen CD30-mFc
Jurkat Klon E6-1 (ATCC TIB 152)	humane T-Zell-Lymphom Zelllinie, in Suspension wachsend, CD30 ⁺	HZI	Bindung an natives Antigen, Viabilitätstests, Internalisierungstests
Karpas299 (ACC 31)	humane T-Zell-Lymphom Zelllinie, in Suspension wachsend, CD30 ⁺	DSMZ	Bindung an natives Antigen, Viabilitätstests, Internalisierungstests

3.1.9 Medien und Supplemente

Tabelle 3-9: Verwendete Medien und Supplemente

Medium / Supplement	Komponente	Konzentration
2xYT Agar	Bacto-Agar in 2xYT Medium	1,5 % (w/v)
2xYT Medium (pH 7,0)	Bacto-Hefeextrakt Bacto-Trypton NaCl	1,0 % (w/v) 1,6 % (w/v) 0,05 % (w/v)
2xYT-GA Medium	2xYT-Medium Glukose Ampicillin	- 100 mM 100 mg/L
Ampicillin	Ampicillin	100 mg/mL
DMEM High Glc (4,5 %) with L-Glutamine	DMEM (PAA Laboratories GmbH) Fötales Kälber Serum (FCS) Penicillin/Streptomycin	1x 4-8 % 1 % (v/v)
Glukoselösung	Glukose	2 M
F17 Medium	FreeStyle F17 Expressionsmedium (Invitrogen, Darmstadt) Fütterung: Trypton N1 (PAA, Pasching, AUS) G418 L-Glutamin (PAA, Pasching, AUS) Pluronic F-68 (Applichem, Darmstadt)	- 0,1 % (w/v) 25 µg/mL 7,5 mM 0,1 % (v/v)
IPTG-Lösung	IPTG	1 M
Penicillin/Streptomycin	Penicillin Streptomycin	10.000 U/mL 10 mg/mL
RPMI 1640 Medium	RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH) FCS Penicillin / Streptomycin	- 8 % (v/v) 1 % (v/v)

Medium / Supplement	Komponente	Konzentration
SOC Medium	Bacto-Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
	Bacto-Trypton	2,0 % (w/v)
	NaCl	0,005 % (w/v)
	MgCl ₂	20 mM
	Glukose	20 mM

3.1.10 Vektoren

Tabelle 3-10: Verwendete Vektoren

Vektorbezeichnung	Verwendung
pANY-TS_XWe_01.12.10	Quelle für die Adapter Ad _{emc} / Ad _{mc}
pCMV-CD30-hlgG1-Fc	Quelle für das Gen CD30
pCMV2.5-hlgG1-Fc-XP	Säugerzell-Expressionsvektor; Produktion von humanen RNasen und scFv-Fc Antikörpern
pCMV5.2-hlgG1-Fc-XP	Säugerzell-Expressionsvektor; Produktion von humanen scFv-Fc Antikörpern und scFv-Fc-RNase Fusionsproteinen
pCMV-mIgG1-Fc-XP	Säugerzell-Expressionsvektor; Produktion des murinen CD30-mFc Fusionsproteins
pCR2.1-RN2, 3, 7	Quelle für die Gene RNase2, 3 und 7 (TS)
pDONR223-RN1, 4, 5, 6	Quelle für die Gene RNase1, 4, 5 und 6
pGEM-T [®] Easy	Integration des RNase8-Gens
pHAL14	Phagemid-Vektor
pOPE101-XP	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor, Produktion von scFv-Fragmenten
pYD5-XbaI	Säugerzell-Expressionsvektor; Produktion von humanen Fc-RNase Fusionsproteinen mit TEV _{cs}

3.1.11 Oligonukleotide

Tabelle 3-11: Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid		DNA-Sequenz (5'-3')	Verwendung
CM2_for	886	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	Kolonie-PCR scFv-Fc, RNasen; Sequenzierung scFv-Fc
MH LacZ Pro f	125	GGCTCGTATGTTGTGTGG	präparative Amplifikation der scFv-Gene
MhgIII_r1	11	CTAAAGTTTTGTCGTCTTCC	präparative Amplifikation der scFv-Gene
MhpOPE_f2	254	CTTAGATTCAATTGTGAGCGG	Kolonie-PCR scFv-Gene; Sequenzierung der scFv-Gene
MhpOPE_r2	255	CTGATCATTAGCACAGGCC	Kolonie-PCR scFv-Gene
MS pCMV-CH3-seq_f	994	GCAGCAGGGGAACGTCTTC	Kolonie-PCR Fc RNasen, scFv-Fc-RNasen; Sequenzierung Fc-RNasen, scFv-Fc-RNasen
NS20_r	887	CAGGAGTTCAGGTGCTGG	präparative Amplifikation des CD30-Gens; Sequenzierung CD30
SP6	818	CATTTAGGTGACACTATAG	Sequenzierung des RNase8-Gens
Tor-pCMV-mIgG01-Fc-seq-f	410	CACTTTGCCTTTCTCTCC	Kolonie-PCR CD30, RNasen, scFv-Fc, scFv-Fc-RNasen; Sequenzierung CD30, RNasen
Tor-pCMV-mIgG01-Fc-seq-r	411	CAGATGGCTGGCAACTAG	Kolonie-PCR CD30, RNasen, scFv-Fc, scFv-Fc-RNasen; Sequenzierung CD30, RNasen, scFv-Fc-RNasen
ToR-pCMV-Seq-f	728	TGGTAGCAACAGCTACAG	Amplifikation des CD30-Gens, Sequenzierung CD30
ToR-pCMV-Seq-r	668	GATGAGTCTGTTACGCTACG	Sequenzierung RNasen
ToR-pCMV-Seq-r	681	CGCCTCAGAAGCCATAGAG	Kolonie-PCR scFv-Fc, RNasen, scFv-Fc-RNasen
XWe_CD30ex NcoI_f	830	GGAAGTCCATGGCTTTCCACA GGATCGACCCTTC	Entfernung der NcoI-Schnittstelle im Gen von CD30

Oligonukleotid		DNA-Sequenz (5'-3')	Verwendung
XWe_CD30ex NcoI_r	831	ACTTCCGCGGCCGCTTCCCCG TGGAGGAGAGAG	Entfernung der NcoI-Schnittstelle im Gen von CD30
XWe_ NcoI_RNase1_f	882	CACTCCATGGGCAAGGAATCCC GGGCCAAG	Präparative Amplifikation des RNase1-Gens mit Anfügen einer NcoI-Schnittstelle vor dem Gen
XWe_PacI_ SP_RNase1_f	911	CATCTTAATTAACGATGGCTCTG GAGAAGTCTC	Präparative Amplifikation des SP_RNase1-Gens mit Anfügen einer PacI-Schnittstelle vor dem Gen
XWe_PacI_ SP_RNase2/3_f	941	CATCTTAATTAACGATGGTTCCA AACTGTTAC	Präparative Amplifikation des SP_RNase2/3-Gens mit Anfügen einer PacI-Schnittstelle vor dem Gen
XWe_PacI_ SP_RNase4_f	942	CATCTTAATTAACGATGGCTCTG CAGAGGAC	Präparative Amplifikation des SP_RNase4-Gens mit Anfügen einer PacI-Schnittstelle vor dem Gen
XWe_PacI_ SP_RNase5_f	943	CATCTTAATTAACGATGGTGATG GGCCTGGG	Präparative Amplifikation des SP_RNase5-Gens mit Anfügen einer PacI-Schnittstelle vor dem Gen
XWe_PacI_ SP_RNase6_f	944	CATCTTAATTAACGATGGTGCTA TGCTTTCCTC	Präparative Amplifikation des SP_RNase6-Gens mit Anfügen einer PacI-Schnittstelle vor dem Gen
XWe_PacI_ SP_RNase7/8_f	945	CATCTTAATTAACGATGGCACC GGCCAGAGC	Präparative Amplifikation des SP_RNase7/8-Gens mit Anfügen einer PacI-Schnittstelle vor dem Gen
XWe_pYD5_ OriP_r	998	CATCGCTGTTCTTAGGAC	Kolonie-PCR Fc-RNasen
XWe_pYD5_ XbaI-Insert_f	995	GGCGGATCCGAATTCTCTAGAA AGCTTGATATC	Einfügen einer XbaI-Schnittstelle in den Vektor pYD5
XWe_pYD5_ XbaI-Insert_r	996	CAGATATCAAGCTTTCTAGAGAA TTCGGATCC	Einfügen einer XbaI-Schnittstelle in den Vektor pYD5
XWe_ RNase1_f	826	GTCAGAAGATCTATGAAGGAAT CCCGGGCCAA	Präparative Amplifikation des RNase1-Gens mit Anfügen einer BglII-Schnittstelle vor dem Gen
XWe_ RNase1_NotI_r	997	TCTTCCGCGGCCGCTTAGGTAG AGTCCTCCACAG	Präparative Amplifikation des RNase1-Gens mit Anfügen einer NotI-Schnittstelle hinter dem Gen
XWe_ RNase1_r	827	CGGCCGCTCTAGATTTAGGTAG AGTCCTCCACAGAAG	Präparative Amplifikation des RNase1-Gens mit Anfügen einer XbaI-Schnittstelle hinter dem Gen
XWe_ RNase2_f1	848	GTCAGAAGATCTATGTCACTCC ATGTCAAACCTC	Präparative Amplifikation des RNase2-Gens mit Anfügen einer BglII-Schnittstelle vor dem Gen
XWe_ RNase2_NotI_r	1046	TCTTCCGCGGCCGCTTAGATGA TTCTATCCAG	Präparative Amplifikation des RNase2-Gens mit Anfügen einer NotI-Schnittstelle hinter dem Gen
XWe_ RNase2_r	849	CGGCCGCTCTAGATTTAGATGA TTCTATCCAGGT	Präparative Amplifikation des RNase2-Gens mit Anfügen einer XbaI-Schnittstelle hinter dem Gen
XWe_ RNase3_f	850	GTCAGAAGATCTATGAGACCCC CACAGTTTACG	Präparative Amplifikation des RNase3-Gens mit Anfügen einer BglII-Schnittstelle vor dem Gen
XWe_ RNase3_NotI_r	1047	TCTTCCGCGGCCGCTTAGATGG TGGTATCCAG	Präparative Amplifikation des RNase3-Gens mit Anfügen einer NotI-Schnittstelle hinter dem Gen
XWe_ RNase3_r	851	CGGCCGCTCTAGATTTAGATGG TGGTATCCAG	Präparative Amplifikation des RNase3-Gens mit Anfügen einer XbaI-Schnittstelle hinter dem Gen
XWe_ RNase4_f	852	GTCAGAAGATCTATGCAGGATG GCATGTACCAG	Präparative Amplifikation des RNase4-Gens mit Anfügen einer BglII-Schnittstelle vor dem Gen
XWe_ RNase4_NotI_r	1048	TCTTCCGCGGCCGCTTAACCGT CAAAGTGAC	Präparative Amplifikation des RNase4-Gens mit Anfügen einer NotI-Schnittstelle hinter dem Gen
XWe_ RNase4_r	853	CGGCCGCTCTAGATCTAACCGT CAAAGTGAC	Präparative Amplifikation des RNase4-Gens mit Anfügen einer XbaI-Schnittstelle hinter dem Gen
XWe_ RNase5_f	854	GTCAGAAGATCTATGCAGGATA ACTCCAGGTAC	Präparative Amplifikation des RNase5-Gens mit Anfügen einer BglII-Schnittstelle vor dem Gen
XWe_ RNase5_Mut_f	1044	GCATCATGAGGAGACGGGGCC CGACCTCACC	Entfernung einer Punktmutation im Gen von RNase5
XWe_ RNase5_Mut_r	1045	GATGTCTTTGCAGGGTGAGGTC GGGCCCCGTC	Entfernung einer Punktmutation im Gen von RNase5
XWe_ RNase5_NotI_r	1049	TCTTCCGCGGCCGCTTACGGAC GACGGAATTTGAC	Präparative Amplifikation des RNase5-Gens mit Anfügen einer NotI-Schnittstelle hinter dem Gen
XWe_ RNase5_r	855	CGGCCGCTCTAGATTTACGGAC GACGGAATTTG	Präparative Amplifikation des RNase5-Gens mit Anfügen einer XbaI-Schnittstelle hinter dem Gen
XWe_ RNase6_f	856	GTCAGAAGATCTATGTGGCCTA AGCGTCTCAC	Präparative Amplifikation des RNase6-Gens mit Anfügen einer BglII-Schnittstelle vor dem Gen
XWe_ RNase6_NotI_r	1050	TCTTCCGCGGCCGCTTAGAGAA TACTATCTAAG	Präparative Amplifikation des RNase6-Gens mit Anfügen einer NotI-Schnittstelle hinter dem Gen
XWe_ RNase6_r	857	CGGCCGCTCTAGATTTAGAGAA TACTATCTAAGTG	Präparative Amplifikation des RNase6-Gens mit Anfügen einer XbaI-Schnittstelle
XWe_RNase7_f	858	GTCAGAAGATCTATGAAGCCCA AGGGCATGAC	Präparative Amplifikation des RNase7-Gens mit Anfügen einer BglII-Schnittstelle vor dem Gen

Oligonukleotid		DNA-Sequenz (5'-3')	Verwendung
XWe_ RNase7_NotI_r	1051	TCTTCCGCGGCCGCCTAAAGGA CTCTGTCCAAG	Präparative Amplifikation des RNase7-Gens mit Anfügen einer NotI-Schnittstelle hinter dem Gen
XWe_ RNase7_r	859	CGGCCGCTCTAGATCTAAAGGA CTCTGTCCAAG	Präparative Amplifikation des RNase7-Gens mit Anfügen einer XbaI-Schnittstelle hinter dem Gen
XWe_ RNase8_f	860	GTCAGAAGATCTATGAAGCCCA AGGACATGAC	Präparative Amplifikation des RNase8-Gens mit Anfügen einer BglII-Schnittstelle vor dem Gen
XWe_ RNase8_if	824	CATCCACCTACCTCCTCAC	Präparative Amplifikation des RNase8-Gens zur Isolation aus humaner cDNA
XWe_ RNase8_ir	825	AGCAGCAGCATACAGTCTG	Präparative Amplifikation des RNase8-Gens zur Isolation aus humaner cDNA
XWe_ RNase8_NcoI_f	1184	GGGCCCATGTCCCTGACTATGG G	Entfernung der NcoI-Schnittstelle im Gen von RNase8
XWe_ RNase8_NcoI_r	1185	GAGGTGAGCTCACCCATAGTCA GG	Entfernung der NcoI-Schnittstelle im Gen von RNase8
XWe_ RNase8_NotI_r	1052	TCTTCCGCGGCCGCTTAGACAA CTTTATCCAAG	Präparative Amplifikation des RNase8-Gens mit Anfügen einer NotI-Schnittstelle hinter dem Gen
XWe_ RNase8_r	861	CGGCCGCTCTAGATTTAGACAA CTTTATCCAAG	Präparative Amplifikation des RNase8-Gens mit Anfügen einer XbaI-Schnittstelle hinter dem Gen
XWe_Spel_ RNase1_for	968	GGTAGTACTAGTAAGGAATCCC GGGC	Präparative Amplifikation des RNase1-Gens mit Anfügen einer SpeI-Schnittstelle vor dem Gen
XWe_Spel_ RNase2_for	1118	GGTAGTACTAGTTCACTCCATGT CAAACCTCC	Präparative Amplifikation des RNase2-Gens mit Anfügen einer SpeI-Schnittstelle vor dem Gen
XWe_Spel_ RNase3_for	1119	GGTAGTACTAGTAGACCCCCAC AGTTTACGAG	Präparative Amplifikation des RNase3-Gens mit Anfügen einer SpeI-Schnittstelle vor dem Gen
XWe_Spel_ RNase4_for	1120	GGTAGTACTAGTCAGGATGGCA GTACCAG	Präparative Amplifikation des RNase4-Gens mit Anfügen einer SpeI-Schnittstelle vor dem Gen
XWe_Spel_ RNase5_for	1121	GGTAGTACTAGTCAGGATAACT CCAGGTAC	Präparative Amplifikation des RNase5-Gens mit Anfügen einer SpeI-Schnittstelle vor dem Gen
XWe_Spel_ RNase6_for	1122	GGTAGTACTAGTTGGCCTAAGC GTCTCACC	Präparative Amplifikation des RNase6-Gens mit Anfügen einer SpeI-Schnittstelle vor dem Gen
XWe_Spel_ RNase7_for	1123	GGTAGTACTAGTAAGCCCAAGG GCATGACCTC	Präparative Amplifikation des RNase7-Gens mit Anfügen einer SpeI-Schnittstelle vor dem Gen
XWe_Spel_ RNase8_for	1124	GGTAGTACTAGTAAGCCCAAGG ACATGACATC	Präparative Amplifikation des RNase8-Gens mit Anfügen einer SpeI-Schnittstelle vor dem Gen

3.1.12 Sonstiges

Tabelle 3-12: Sonstiges

Produkt	Hersteller / Quelle
CypHer5E	GE Healthcare, München
DNA-Massenstandard GeneRuler™ 1kB Plus	Fermentas, St. Leon-Rot
Kontrollantikörper 4E3 (CD30-spezifisch)	Z. Konthur, MPI für molekulare Genetik, Berlin; Menzel <i>et al.</i> [76]
Kontrollantikörper MS112-IIB1 (nicht-CD30-spezifisch)	Schütte <i>et al.</i> [85]
Protein-Massenstandard Precision Protein ladder Dual Color / Unstained	Bio-Rad, München
RNase-Inhibitor (RNasin®)	Promega, Mannheim
RNase-Substrate 6-FAM-dA-rC/rU-dAdA-6-BHQ1	Biomers, Ulm

3.2 Methoden

3.2.1 Allgemeines

Sterilisation und Medien

Die Sterilisation von Flüssigkeiten erfolgte für 20 min bei 121 °C. Glukose und Antibiotika wurden getrennt von den Medien sterilisiert und anschließend unter sterilen Bedingungen mit diesen vereinigt.

Die Herstellung von Festmedien erfolgte durch Zugabe von 15 g/L Bacto-Agar zu den Flüssigmedien.

3.2.2 Molekulargenetische Methoden

Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmid-DNA erfolgte nach Herstellerangaben mit den Kits NucleoSpin Plasmid, NucleoBond Xtra Midi oder ZR Plasmid Miniprep_Classic aus *E. coli* ü.N. Flüssigkulturen. Die DNA-Konzentration wurde anschließend photometrisch bestimmt.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) umfasst die exponentielle Anreicherung einer DNA-Sequenz, die von zwei spezifischen Oligonukleotiden (Primern) eingerahmt ist [86].

Die präparative PCR wurde zur Amplifikation von Genen eingesetzt, die in einen anderen Vektor integriert werden sollten. Durch das Design von entsprechenden Primern war es möglich, den Genen spezielle Linker und/oder Restriktionsschnittstellen anzufügen.

Die analytische Kolonie-PCR diente dem Nachweis der erfolgreichen Integration eines Gens in einen Vektor.

Die verwendeten PCR-Programme und die Zusammensetzungen der PCR-Ansätze sind in Tabelle 3-13 bis Tabelle 3-15 wiedergegeben.

Tabelle 3-13: PCR-Programm zur Amplifikation

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	} 30 Zyklen
Initiale Denaturierung	98	180	
Denaturierung	98	30	
Primer-Annealing	variabel	30	
Elongation	72	60	
Abschluss	72	300	
Ende	16	∞	

Tabelle 3-14: PCR-Programme zur Amplifikation mit Anfügen von Linkern/Restriktionsschnittstellen

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	
Initiale Denaturierung	98	300	
Denaturierung I	98	30	10 Zyklen
Primer-Annealing I	52-55	30	
Elongation I	72	30	
Denaturierung II	98	30	20 Zyklen
Primer-Annealing II	60-65	30	
Elongation II	72	30	
Abschluss	72	300	
Ende	16	∞	

Tabelle 3-15: Zusammensetzungen der PCR-Ansätze

	Präparative Amplifikation	Analytische Kolonie-PCR
Verwendete Polymerase	Phusion (5 U/μL)	Red Taq (1 U/mL)
Probenmenge	2 ng	gepickte Kolonie
Polymerase	1 μL	1 μL
Polymerase-Puffer	10 μL	5 μL
10 mM dNTPs	1 μL	1 μL
Primer (forward) 10 pmol/μL	1 μL	1 μL
Primer (reverse) 10 pmol/μL	1 μL	1 μL
dH ₂ O	variabel	41 μL
Σ	50 μL	50 μL

QuikChange® Site-Directed Mutagenesis

Zur sequenzspezifischen Mutagenese doppelsträngiger DNA wurde die QuikChange® Site-Directed Mutagenesis (Stratagene) angewandt. Dazu mussten zunächst spezifische Oligonukleotide erstellt werden, die die Mutation in der DNA ermöglichen. Das Entfernen oder Einfügen von Restriktionsschnittstellen wurde dann gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

Isolation des RNase8-Gens aus humaner cDNA

Das Gen der humanen RNase8 wurde aus humaner PBMC-cDNA isoliert. Dazu wurde mit Oligonukleotiden, die das Gen flankieren, eine PCR mit verschiedenen Annealing-Temperaturen durchgeführt (Tabelle 3-16 und Tabelle 3-17).

Tabelle 3-16: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes der Isolation des RNase8-Gens

Komponente		Volumen [μL]
DNA-Template	humane cDNA	0,5
Primer 1 [10 pmol/μL]	XWe_RNase8_if	0,5
Primer 2 [10 pmol/μL]	XWe_RNase8_ir	0,5
10 mM dNTPs		1
Polymerase Puffer	5x Phusion-Buffer HF	4
Polymerase	Phusion	0,5
dH ₂ O		13
Σ		20

Tabelle 3-17: PCR-Programm der Isolation des RNase8-Gens

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	} 30 Zyklen
Initiale Denaturierung	98	180	
Denaturierung	98	30	
Primer-Annealing	Gradient 45-60	20	
Elongation	72	30	
Abschluss	72	600	
Ende	16	∞	

Das PCR-Produkt wurde anschließend mit einem Poly-A Überhang versehen und gemäß den Herstellerangaben über T/A-Klonierung in den Vektor pGEM®-T Easy (Promega) integriert.

Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese diente der Größenauftrennung und -bestimmung von DNA-Fragmenten. Die DNA-Proben wurden mit 1x Ladepuffer versetzt und anschließend in Gelen mit 0,7-2 % (w/v) Agarose und 25 mM Ethidiumbromid in 1x TAE-Puffer gelelektrophoretisch getrennt (130 V, 300 mA, 35 min). Anschließend wurden die Banden in der Geldokumentationsanlage mittels UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert. Die Bestimmung der Fragmentgrößen erfolgte durch Vergleich mit dem Standard GeneRuler™ 1 kB Plus.

Reinigung von DNA-Proben

Die Reinigung der DNA-Proben erfolgte nach Herstellerangaben mit dem Kit NucleoSpin Extract II. Die DNA-Konzentration wurde anschließend photometrisch ermittelt.

Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop

Die Konzentration von gereinigten DNA-Fragmenten und präparierter Plasmid-DNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem Gerät NanoDrop ND-1000 bestimmt.

Restriktionsverdau und Dephosphorylierung

Der Restriktionsverdau mit Typ-II-Restriktionsendonukleasen ist eine enzymatische Reaktion, bei der DNA an spezifischen Sequenzen geschnitten wird (Tabelle 3-18). Eine anschließende Ligation ist nur bei gleichartig geschnittenen Sequenzen möglich.

Tabelle 3-18: Zusammensetzung der Restriktionsverdauansätze

Komponente	Volumen / Konzentration
DNA	Vektor ~5 µg / Insert ~1 µg
Restriktionsenzym I (10 U/µL)	2 µL
Restriktionsenzym II (10 U/µL)	2 µL
Puffer NEB1-4 10x	5 µL
BSA 100x	0,5 µL
dH ₂ O	auf 50 µL
Σ	50

Nach dem Restriktionsverdau wurden die Enzyme hitzeinaktiviert. Um eine Religation von geschnittenen Vektoren zu vermeiden, wurden die endständigen 5'-Phosphatgruppen durch Zugabe des Enzyms *Calf Intestine Phosphatase* (CIP) entfernt (zweimal 0,5 µL CIP für je 30 min bei 37 °C). Anschließend folgte eine Reinigung der DNA.

Ligation

Während der Ligation werden linearisierte DNA-Elemente mit komplementären Enden durch das Enzym Ligase miteinander verknüpft. Diese Reaktion dient oft der Verknüpfung von Vektor und Insert. Die Masse des Inserts berechnet sich bei gegebener Masse des Vektors (50 ng) mit Hilfe folgender Gleichung:

$$\text{Masse}_{\text{Insert}} [\text{ng}] = 3 * \text{Masse}_{\text{Vektor}} [\text{ng}] * \text{Länge}_{\text{Insert}} [\text{bp}] / \text{Länge}_{\text{Vektor}} [\text{bp}] \quad (\text{Gleichung 1})$$

Die Reaktion wurde ü.N. bei 16 °C mit dem Enzym T4-DNA-Ligase durchgeführt. Anschließend folgte eine Hitzeinaktivierung des Enzyms (10 min, 65 °C). Die folgende Tabelle 3-19 führt die Zusammensetzung eines Ligationsansatzes auf.

Tabelle 3-19: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes

Komponente	Volumen [µL]
Vektor	x (50 ng)
Insert	y (Gl. 1)
Ligase Puffer	1,0
Ligase	0,4
dH ₂ O	8,5 - x - y
Σ	10,0

Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR dient der Überprüfung des Ligationserfolges. Dazu wurden mindestens 16 h nach der Transformation mittels Hitzeschock von den 2xYT-GA-Platten Kolonien gepickt und eine PCR durchgeführt (siehe *Polymerasekettenreaktion (PCR)*).

Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Abschnitten erfolgte durch die Firma GATC. Dazu wurden die entsprechenden Oligonukleotide und die gereinigten PCR-Ansätze bzw. Plasmide verschickt. Die Chromatogramme der DNA-Sequenzen wurden mit der Software FinchTV 1.4 ausgewertet.

3.2.3 Mikrobiologische Methoden

Bestimmung der Zelldichte

Zur Bestimmung der Zelldichte wurde die optische Dichte der Kultursuspension bei einer Wellenlänge von 600 nm ermittelt. Als Referenz wurde das Medium vor dem Beimpfen verwendet.

Lagerung von Mikroorganismen - Glycerinstock

Zur permanenten Lagerung von Mikroorganismen wurde ein Glycerinstock der Kultursuspension mit 20 % (v/v) Glycerin angelegt und bei -80 °C gelagert.

Transformation von E. coli mittels Hitzeschock

Das Einbringen von DNA-Elementen in Bakterienzellen wurde mittels Transformation durchgeführt. Dafür wurden 50 µL kompetente *E. coli* XL1-Blue MRF' Zellen langsam aufgetaut und mit dem Ligationsansatz bzw. dem Plasmid vereint. Nach einer Inkubation für 20 min auf Eis folgte ein Hitzeschock (1 min, 42 °C) und eine weitere Inkubation auf Eis (2 min). Nach Zugabe von 950 µL SOC-Medium (37 °C) wurden die Zellen bei 600 rpm für 1 h bei 37 °C inkubiert, anschließend auf 2xYT-GA-Platten ausplattiert und ü.N. bei 37 °C inkubiert.

Produktion von scFv-Antikörperfragmenten in E. coli

Die Produktion von scFv-Antikörperfragmenten erfolgte mit dem *E. coli*-Expressionsvektor pOPE101-XP im Schüttelkolbenmaßstab. Dazu wurde eine Kultur von 250 mL 2xYT-GA Medium mit einer Übernachtskultur auf eine OD von ~0,07 beimpft und bis zu einer OD von 0,5 bei 37 °C und 250 rpm kultiviert. Die Induktion der Proteinexpression wurde durch Zugabe von 50 µM IPTG eingeleitet. Die Produktion erfolgte 3 h lang bei 30 °C und 200 rpm. Anschließend wurde die Kultur bei 4200 xg für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Die scFv-Fragmente wurden aus dem Kulturüberstand mittels Ammoniumsulfatfällung und aus dem Zellpellet mittels Isolation der periplasmatischen Fraktion gewonnen.

3.2.4 Biochemische und -physikalische Methoden

Ammoniumsulfatfällung von Kulturüberstand

Zur Gewinnung der produzierten scFv-Fragmente aus dem Kulturüberstand wurde eine Ammoniumsulfatfällung (AS) durchgeführt. Zu 250 mL Kulturüberstand wurden 100 g Ammoniumsulfat gegeben, für mindestens 20 min in einem Überkopfschüttler gelöst und anschließend bei 8300 xg und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 mL PBS resuspendiert und ü.N. bei 4 °C gegen PBS dialysiert.

Isolation der periplasmatischen Fraktion von E. coli

Zur Gewinnung von produzierten scFv-Fragmente aus dem Periplasma von *E. coli* XL1-Blue MRF' Zellen (periplasmatische Präparation, PPP) wurde das Kulturpellet aus einer 250 mL-Kultur in 20 mL eiskaltem PE-Puffer resuspendiert, für 20 min bei 4 °C in einem Überkopfschüttler inkubiert und dann bei 20000 xg für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand enthielt die gelösten scFv-Fragmente und wurde ü.N. bei 4 °C gegen PBS dialysiert.

Proteolytischer Verdau mit TEV-Protease

Nach der Produktion der hFc-TEV_{cs}-RNasen1-8 wurden diese zunächst mittels Affinitätschromatographie (Protein A, Profinia™) gereinigt. Anschließend erfolgte die Abspaltung der RNase von dem humanen Fc-Teil durch einen proteolytischen Verdau mittels TEV-Protease. Pro mg Fusionsprotein wurden 50 µg TEV-Protease eingesetzt und für 16 h bei 30 °C inkubiert. Der Erfolg des Verdau wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Die weitere Reinigung erfolgte mittels präparativer Größenausschlusschromatographie, die eine Abtrennung der Protease und des Fc-Teils von der RNase ermöglichte.

Reinigung von Proteinen

Die Reinigung der Proteine wurde entweder mittels *Immobilized Metal Affinity Chromatography* (IMAC), Ionenaustauschchromatographie, präparativer Größenausschlusschromatographie oder Protein A Affinitätschromatographie durchgeführt.

Reinigung von scFv-Fragmenten mittels IMAC im Batch-Verfahren

Für die Reinigung der scFv-Fragmente wurden die dialysierten Proteinlösungen aus AS und PPP vereinigt und auf eine Endkonzentration von 10 mM Imidazol und 0,5 M NaCl eingestellt. Die Lösung wurde mit 1 mL Chelating Sepharose Fast Flow (mit Nickel²⁺ beladen) vereinigt und 30 min bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 500 xg wurde das Pellet insgesamt viermal gewaschen (Bindepuffer, zweimal Waschpuffer, PBS). Anschließend folgten die Elution mit 3 mL Elutionspuffer und eine Dialyse ü.N. bei 4 °C gegen PBS. Die Proben wurden sterilfiltriert (0,2 µm) und bei -20 °C gelagert.

Reinigung von RNasen mittels Ionenaustauschchromatographie

Die Reinigung der RNasen aus dem Kulturüberstand der Säugerzell-Expression wurde aufgrund der hohen pI-Werte der RNasen mittels Kationenaustauschchromatographie durchgeführt. Die Realisierung mittels Äkta prime™ und der Chromatographiesäule HiTrap SP XL erfolgte nach Herstellerangaben. Alle Proben und Puffer wurden vor der Reinigung sterilfiltriert (0,45 µm) und entgast. Die Flussrate betrug bei allen Schritten 1 mL/min. Die Probe wurde zunächst auf pH 7,0 eingestellt und dann auf die Säule geladen. Es folgte ein Waschschritt mit Waschpuffer, bis sich ein konstanter Leitfähigkeitswert eingestellt hatte. Die Elution erfolgte in einem Gradienten von 0-100 % Elutionspuffer über eine Laufstrecke von 20 mL. Die Proben wurden als 1 mL Fraktionen gesammelt und ü.N. gegen PBS dialysiert. Nach der Sterilfiltration (0,2 µm) wurden die Proben bei 4 °C gelagert.

Reinigung von RNasen mittels präparativer Größenausschlusschromatographie

Die RNasen, die als hFc-TEV_{cs}-RNase Fusionsproteine produziert wurden, wurden nach dem proteolytischen Verdau mit der TEV-Protease von dem hFc-Teil und der Protease durch

eine präparative Größenausschlusschromatographie getrennt. Die Reinigung von 5 mL Probe erfolgte mit der Säule HiLoad16-60 Superdex75 bei einer Flussrate von 0,5 mL/min. Das Eluat wurde als 1 mL große Fraktionen gesammelt und mittels SDS-PAGE analysiert. Die RNase-enthaltenden Fraktionen mit ähnlichen Konzentrationen wurden vereinigt, sterilfiltriert (0,2 µm) und bei 4 °C gelagert.

Reinigung des Antigens CD30-mFc

Das produzierte Antigen CD30-mFc wurde aus dem Kulturüberstand der Säugerzell-Expression mittels Protein A Affinitätschromatographie gereinigt. Die Probe wurde zunächst 30 min bei 3200 xg und 4 °C zentrifugiert, sterilfiltriert (0,45 µm) und entgast. Die Reinigung wurde mit der Äkta prime™ und der Chromatographiesäule HiTrap™ rProtein A Fast Flow durchgeführt. Die Flussrate betrug bei allen Schritten 1 mL/min. Die Elution erfolgte fraktioniert (1 mL) mit 100 % Elutionspuffer. Die Elutionsfraktionen wurden durch 200 µL Neutralisationspuffer neutralisiert, mittels SDS-PAGE analysiert und Fraktionen mit ähnlichen Konzentrationen gegebenenfalls vereinigt. Nach der Dialyse gegen PBS ü.N. wurden sie sterilfiltriert (0,2 µm) und bei 4 °C gelagert.

Reinigung von scFv-Fc Antikörpern und scFv-Fc-RNase Fusionsproteinen mittels Protein A

Die produzierten scFv-Fc Antikörper und scFv-Fc-RNase Fusionsproteine wurden aus dem Kulturüberstand der Säugerzell-Expression mittels Protein A Affinitätschromatographie gereinigt. Die Proben wurden zunächst 30 min bei 3200 xg und 4 °C zentrifugiert, sterilfiltriert (0,45 µm) und entgast. Die Reinigung wurde entweder mit der Äkta prime™ und der Chromatographiesäule MabSelect SuRe oder mit der Profinia™ und der Chromatographiesäule Bio-Scale™ Mini UNOsphere Supra durchgeführt.

Die Flussrate bei der Reinigung mittels Äkta prime™ betrug bei allen Schritten 1 mL/min. Die Elution erfolgte fraktioniert (1 mL) mit 100 % Elutionspuffer. Die Elutionsfraktionen wurden durch 250 µL Neutralisationspuffer neutralisiert, mittels SDS-PAGE analysiert und Fraktionen mit ähnlichen Konzentrationen gegebenenfalls vereinigt. Nach der Dialyse gegen PBS ü.N. wurden sie sterilfiltriert (0,2 µm) und bei 4 °C bzw. -80 °C gelagert.

Bei der Reinigung mittels Profinia™ wurden die Proben nach der Protein A Reinigung mittels Bio-Scale™ Mini Bio-Gel P-6 Desalting Cartridge entsalzt. Die Elutionsfraktion (4 mL) wurde anschließend mittels SDS-PAGE analysiert, sterilfiltriert (0,2 µm) und aliquotiert bei -80 °C bzw. 4 °C gelagert.

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die SDS-PAGE wurden die Proteinproben mit Laemmli-Puffer versetzt. Für reduzierende Bedingungen wurde Laemmli-Puffer mit β-Merkaptoethanol (β-ME) verwendet und die Proben für 10 min bei 95 °C denaturiert. Für nicht-reduzierende Bedingungen wurde Laemmli-Puffer ohne β-ME verwendet und die Proben für 10 min bei 56 °C erhitzt. Die

apparenten molekularen Massen wurden durch Vergleich mit einem Standard (Precision Protein ladder Unstained) bestimmt. Die Auftrennung erfolgte bei 25 mA und 300 V für 45 min in Gelen mit folgender Zusammensetzung:

Tabelle 3-20: Zusammensetzung eines Sammelgels (4 %)

Komponente	Volumen [mL]
dH ₂ O	1
Acrylamidmix	0,26
1,0 M Tris HCl pH 6,8	0,20
10 % SDS	0,015
10 % APS	0,015
TEMED	0,002

Tabelle 3-21: Zusammensetzung eines Tenngels (8-18 %)

Acrylamidkonz.	8 %	10 %	12 %	15 %	18 %
Komponente	Volumen [mL]				
dH ₂ O	1,8	1,6	1,3	0,9	0,5
Acrylamidmix	1,1	1,3	1,6	2,0	2,4
1,5 M Tris HCl pH 8,8	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
10 % SDS	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
10 % APS	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
TEMED	0,003	0,002	0,004	0,002	0,002

Coomassiefärbung

Für die Coomassiefärbung wurde das SDS-Gel in der Färbelösung für 1 min in einem Mikrowellenofen erhitzt und nach kurzem Waschen mit H₂O auf gleiche Weise mit Entfärbelösung entfärbt. Anschließend wurde die Hintergrundfärbung durch Waschen mit H₂O über einen längeren Zeitraum minimiert und das Ergebnis dokumentiert.

Silberfärbung

Für die Silberfärbung wurde das SDS-Gel zunächst für 1,5 h bei RT in Fixiererlösung inkubiert. Anschließend folgte ein dreimaliger Waschschrift mit 50 % Ethanol für je 20 min und eine Inkubation in Natriumthiosulfatlösung für 1 min. Nach dreimaligem Waschen mit H₂O für je 20 s wurde das Gel für 20 min in Silberlösung gefärbt. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit H₂O für je 20 s wurde das Gel in Entwicklerlösung bis zum Sichtbarwerden der Banden (1-10 min) inkubiert. Es wurde gründlich mit H₂O gewaschen und die Reaktion mit Stopplösung beendet. Das Gel wurde in H₂O gelagert und das Ergebnis dokumentiert.

Proteinquantifizierung

Die Quantifizierung des Antigens CD30-mFc, der scFv-Fragmente und der RNasen wurde mit Hilfe der Computersoftware ImageJ durchgeführt, die eine densitometrische Ermittlung der Probenkonzentrationen in Proteingelen ermöglicht.

Dazu wurden jeweils gleiche Volumina der Proteinproben und der Proben einer Standard-Verdünnungsreihe in einem SDS-Gel aufgetrennt. Für das Antigen CD30-mFc wurde als Standard BSA, für die scFv-Fragmente das Standard-scFv-Fragment TM44-C7 und für die RNasen die bovine RNase A verwendet. Anschließend wurde das Gel mittels Coomassiefärbung gefärbt und eingescannt. Die Software ImageJ bestimmt die Proteinkonzentrationen durch einen Vergleich der Farbintensitäten der Proben und Standards.

Western Blot

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden die Banden auf eine zuvor in Methanol aktivierte PVDF-Membran übertragen. Dafür wurden ein in Blotpuffer getränktes Filterpapier, die Membran, das Gel und ein weiteres Filterpapier übereinandergeschichtet und für 35 min eine Spannung von 20 V (770 mA) angelegt.

Immunfärbung

Die mittels Western Blot auf die PVDF-Membran übertragenen Proteine wurden mittels Immunfärbung nachgewiesen. Dazu wurde die Membran zunächst ü.N. bei 4 °C in Blocklösung inkubiert. Anschließend erfolgte ein Inkubationsschritt mit dem ersten Nachweisantikörper in Blocklösung für 1 h bei RT. Nach einem Waschschrift mit Waschpuffer für 5 min bei RT folgte die Inkubation mit dem zweiten Nachweisantikörper in Blocklösung für 1 h bei RT. Es wurde erneut mit Waschpuffer und anschließend mit Substratpuffer für jeweils 5 min bei RT gewaschen. Die Visualisierung der Banden erfolgte durch Inkubation mit 1/100 (v/v) BCIP und 1/100 (v/v) NBT in Substratpuffer und wurde bei ausreichender Färbung durch gründliches Spülen mit H₂O gestoppt.

Immunfärbung mit anti-humane-RNase1 Antiserum

Zum Nachweis der Produktion von humaner RNase1 wurde die Probe zunächst gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Nachweis erfolgte über ein affinitätsgereinigtes Kaninchen anti-humane-RNase1 Serum und einen Ziege anti-Kaninchen IgG AP-konjugierten Antikörper.

Immunfärbung mit anti-human IgG (Fc-spez.) Antikörpern

Zur Überprüfung der Bindung der produzierten CD30-spezifischen scFv-Fc Antikörper an das Antigen CD30-mFc wurde die Mini-Protean II Multi Screen-Kammer eingesetzt. Die Menge des Antigens wurde so gewählt, dass nach dem Transfer auf die PVDF-Membran und dem Einspannen dieser in die Kammer 1 µg Antigen pro Spur vorhanden waren. Es wurden 500 ng scFv-Fc Antikörper pro Spur eingesetzt. Der Nachweis erfolgte über einen Ziege anti-human IgG (Fc-spezifischen) AP-konjugierten Antikörper.

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA wurde in 96 well Mikrotiterplatten (Maxisorp) durchgeführt. Das nachzuweisende Protein wurde in 100 µL PBS bei 4 °C ü.N. in den Vertiefungen immobilisiert. Nach dem Blocken der freien reaktiven Oberflächen mit 270 µL Blockpuffer für 1 h bei RT folgte die Inkubation mit den Nachweisproteinen in 100 µL Blockpuffer für jeweils 1 h bei RT. Nach dem Blocken und jeder Inkubation wurde dreimal mit Waschpuffer im ELISA-Washer gewaschen. Die Detektionsreaktion erfolgte durch Zugabe von 100 µL Entwicklerlösung je Vertiefung und wurde bei ausreichender Färbung mit 100 µL Stopplösung beendet. Die

Auswertung geschah durch die Ermittlung der Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzmessung bei 620 nm) mittels ELISA-Reader.

Antigen-ELISA mit CD30-spezifischen scFv-Fragmenten

Für den Nachweis der Bindung der produzierten CD30-spezifischen Antikörper an das rekombinante Antigen CD30-mFc wurden 1 µg des Antigens und als Kontrolle 1 µg BSA pro Vertiefung immobilisiert. Es wurde jeweils 1 µg der scFv-Fragmente für den ELISA eingesetzt. Der Nachweis erfolgte über einen Maus anti-C-Myc-tag Antikörper und einen Ziege anti-Maus IgG (Fab-spezifischen) HRP-konjugierten Antikörper.

Titration-ELISA mit CD30-spezifischen scFv-Fc Antikörpern

Für einen Vergleich der Bindungseigenschaften der produzierten CD30-spezifischen Antikörper wurden 100 ng des Antigens CD30-mFc pro Vertiefung immobilisiert. Die scFv-Fc Antikörper wurden in Mengen von 500 ng bis 0,5 ng für den ELISA eingesetzt. Der Nachweis erfolgte über einen Ziege anti-human IgG (Fc-spezifischen) HRP-konjugierten Antikörper.

Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)

Für die kinetischen Untersuchungen der Bindung der CD30-spezifischen scFv-Fragmente an das Antigen CD30-mFc wurde die Oberflächenplasmonenresonanztechnologie angewandt. Dazu wurde das Antigen sowie als Referenz BSA auf einem CM5-Chip gemäß der Empfehlung des Herstellers (BIAapplications Handbook) immobilisiert. Die Aktivierung der Chipoberfläche geschah durch NHS und EDC. Das rekombinante Antigen CD30-mFc (30 µg/mL) sowie BSA (5 µg/mL) wurden in 10 mM Natrium-Acetat-Lösung mit dem vorher ermittelten pH-Wert von 3,5 gekoppelt. Die verbliebenen reaktiven Gruppen wurden mit einer 1 M Ethanolamin-HCl-Lösung pH 8,5 abgesättigt.

Für die Bestimmung der Kinetiken wurden unterschiedliche Konzentrationen der scFv-Fragmente in Puffer (1000 nM bis 0 nM) mit einer Flussrate von 25 µL/min über das Antigen bzw. BSA geleitet und die Bindungseigenschaften aufgenommen. Die Assoziationsphase betrug jeweils 250 s, die Dissoziationsphase jeweils 900 s. Vor jeder Konzentrationsänderung der scFv-Fragmente erfolgte eine Regeneration des immobilisierten Antigens mit Hilfe von 10 mM NaOH-Lösung (10 µL/min für 1,5 min). Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte gemäß den Angaben im BIAevaluation Handbook mit der BIAevaluation Software.

Analytische Größenausschlusschromatographie

Das Aggregationsverhalten bzw. die Bildung von Di-, Tri-, Tetra- oder Multimeren der produzierten scFv-Fragmente, scFv-Fc Antikörper und scFv-Fc-RNase Fusionsproteine wurde mittels analytischer Größenausschlusschromatographie an dem Äkta purifier System untersucht. Für die scFv-Fragmente wurde eine Superdex75 Highload 16-60 Säule bei einer

Flussrate von 0,75 mL/min verwendet und jeweils 40 µg (300-500 µL) Protein appliziert. Für die scFv-Fc Antikörper und scFv-Fc-RNase Fusionsproteine kam eine Superdex200 10/300 GL Säule zum Einsatz. Es wurden jeweils 100 µg (100-500 µL) der Proteine bei einer Flussrate von 0,3 mL/min untersucht. Der Verlauf der Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm wurde ausgewertet. Um eine Korrelation zwischen der Retentionszeit und der Masse des Proteins herstellen zu können, wurde zuvor eine Kalibrierung mit Proteinen definierter Größe durchgeführt.

Stabilitätsanalyse

Zum Ausschluss von Degradationen der scFv-Fc Antikörper und scFv-Fc-RNase Fusionsproteine über einen Zeitraum von 72 h wurde eine Stabilitätsanalyse durchgeführt. Dazu wurden die Proteine 72 h lang in PBS bei 37 °C gelagert und nach jeweils 24 h Proben entnommen. Jeweils 1 µg dieser Proben wurde anschließend per SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen auf sichtbare Degradationen untersucht.

RNase-Aktivitätstest

Die ribonukleolytische Aktivität der produzierten RNasen und scFv-Fc-RNase Fusionsproteine wurde mittels RNase-Aktivitätstest untersucht. Für diesen Test wurden Substrate mit dem Fluorophor 6-Carboxyfluorescein (6-FAM) verwendet, dessen Fluoreszenz durch den Black-Hole-Quencher 1 (BHQ1) ausgelöscht wird (Prinzip des *fluorescence quenching*). Erst die Spaltung der Substrate 6-FAM-dA-rC/rU-dAdA-6-BHQ1 (modifiziert nach [87]; Abbildung 3-1) durch die RNase geht mit einer detektierbaren Fluoreszenz einher, deren Intensität proportional zu der Aktivität der eingesetzten RNase ist.

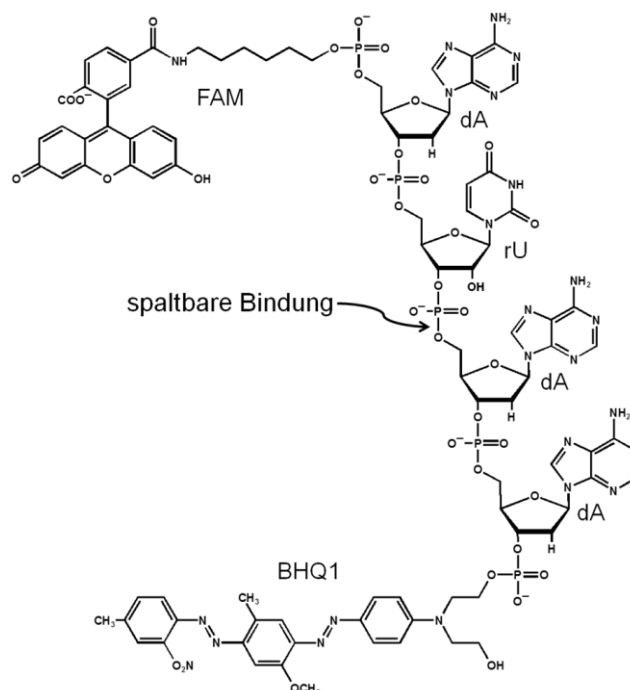


Abbildung 3-1: Chemische Struktur des Substrates 6-FAM-dArUdAdA-6-BHQ1

Für den Test wurden die RNasen (je nach RNase 0,1 nM bis 50 nM) in 150 µL MES-Puffer in einer schwarzen 96 well Mikrotiterplatte vorgelegt und die Messung durch Zugabe von 5 nM Substrat in 50 µL MES-Puffer gestartet. Die kinetische Messung wurde mit dem Tecan Ultra bei einer Verstärkung von 70, einer Z-Position von 7800 µm, einer Integrationszeit von 40 µs und mit dreimaliger Anregung durchgeführt. Die durch die Umsetzung des Substrates entstehende Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 485 nm angeregt und bei einer Wellenlänge von 535 nm detektiert. Es wurden zunächst 15 Messzyklen à 30 s, dann 60 Messzyklen à 2 min und bei Bedarf weitere Messzyklen à 10 min (mehrere Stunden bis ü.N.) durchgeführt. Die Reaktion galt als beendet, sobald keine Änderung der Fluoreszenz mehr festgestellt werden konnte (Sättigung).

Die Konstante k_{cat}/K_M (Enzymeffizienz, engl. *enzyme efficiency*) wurde mit der molaren Konzentration der RNase ([RNase]), der Anfangssteigung v_0 und dem erreichten Endwert der Messung (ΔF) nach Gleichung 2 ermittelt.

$$k_{\text{cat}}/K_M = \frac{V_0}{\Delta F * [\text{RNase}]} \quad (\text{Gleichung 2})$$

V_0 : Anfangssteigung des Fluoreszenzsignals [s^{-1}]

ΔF : Endwert des Fluoreszenzsignals

[RNase] RNase-Konzentration [mol]

RNase-Inhibitionstest

Zur Ermittlung der Inhibition der Aktivität der produzierten RNasen und scFv-Fc-RNase Fusionsproteine wurde der RNase-Aktivitätstest unter modifizierten Bedingungen durchgeführt. Zusammen mit der RNase wurde der RI in 150 µL MES-Puffer in der Mikrotiterplatte vorgelegt und 15 min inkubiert. Der Inhibitor wurde dabei in einer äquimolaren Menge und im molaren Überschuss von 5:1 und 20:1 eingesetzt. Anschließend wurde die Messung durch Zugabe des Substrates (5 nM in 50 µL MES-Puffer) gestartet und wie unter *RNase-Aktivitätstest* beschrieben durchgeführt.

Markierung von Proteinen mit einem pH-sensitiven Farbstoff

Für den Nachweis der Internalisierung des Antikörpers SH313-B5-hFc und der Immun-RNasen in CD30⁺ Zellen wurden diese mit dem pH-sensitiven Farbstoff CyHer5E Mono NHS Ester markiert. Dieser Farbstoff hat eine sehr geringe Fluoreszenz bei den pH-Werten des Kultivierungsmediums und des Zytoplasmas (pH 7,2-7,4), wohingegen er seine maximale Fluoreszenz bei saurem pH-Wert aufweist. Nach Internalisierung in saure intrazelluläre Kompartments, hauptsächlich in die Endosomen, fluoresziert der Farbstoff bei einer Wellenlänge von 663 nm (rot). Die Markierung der Proteine wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt [88].

3.2.5 Zellbiologische Methoden

Kultivierung von humanen Zellen

Adhärente und semiadhärente Zellen wurden alle 2-3 Tage gesplittet. Dazu wurde das Medium verworfen, die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und mit 1 mL Trypsin/EDTA von den Kulturschalen gelöst. Anschließend wurden ~1/5 der Zellen in eine neue Kulturschale transferiert, mit 13 mL frischem Medium überschichtet und gleichmäßig verteilt.

Die Suspensionszellen wurden alle 2-3 Tage gesplittet. Dazu wurden sie zunächst 5 min bei 500 xg und RT zentrifugiert und das Medium verworfen. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauerkammer bestimmt. Die Zellen wurden in einer Dichte von $2-4 \cdot 10^5$ Zellen/mL mit 13-20 mL frischem Medium eingesät.

Eine Übersicht über die Zelllinien und deren Kultivierungsbedingungen gibt Tabelle 3-22.

Tabelle 3-22: Übersicht über die verwendeten Zelllinien und deren Kultivierung

Zelllinie	Wachstum	Kultivierungsmedium	Kultivierung
HD-MY-Z	semiadhärent	RPMI + 8 % FCS + 1% P/S	37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % Luftfeuchte
HEK293 6E	Suspension	F17 + 25 µg/mL G418 + 7,5 mM L-Glutamin + 0,1 % Pluronic F-68	37 °C, 5 % CO ₂ , 110 rpm
HEK293 T	adhärent	DMEM + 8 % FCS + 1% P/S	37 °C, 7 % CO ₂ , 95 % Luftfeuchte
Jurkat Klon E6-1	Suspension	RPMI + 8 % FCS + 1% P/S	37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % Luftfeuchte
Karpas299	Suspension	RPMI + 8 % FCS + 1% P/S	37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % Luftfeuchte

Auftauen und Einfrieren von humanen Zellen

Die Zellen waren in Cryoröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zum Auftauen wurden die Zellen mit 13 mL Kultivierungsmedium (37 °C) versetzt und resuspendiert. Nach einem Zentrifugationsschritt für 5 min bei 500 xg und RT wurde das Medium verworfen und die Zellen mit 13 mL frischem Kultivierungsmedium in eine Kulturschale ausgesät.

Zur Lagerung der Zellen wurden diese in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurden die Zellen 5 min bei 500 xg und 4 °C zentrifugiert und in Kultivierungsmedium mit 40 % FCS resuspendiert. Anschließend wurde nach und nach das gleiche Volumen Kultivierungsmedium mit 20 % DMSO mit der Zelllösung auf Eis vermengt. Die Zelllösung wurde in Cryoröhrchen gefüllt, zunächst bei -80 °C eingefroren und nach 24 h in flüssigen Stickstoff überführt.

Bestimmung der Zellzahl und Zellviabilität

Zur Bestimmung der Zellzahl und zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen wurden Zellsuspensionen mit Trypanblau versetzt. Dieser Farbstoff färbt tote Zellen an. Anschließend wurde die Anzahl an lebenden und toten Zellen mittels Neubauerzählkammer bestimmt und die Zelldichte (Zellen/mL), die Gesamtzellzahl und der Anteil an lebenden Zellen berechnet.

Produktion von Proteinen in humanen Zellen

Das Antigen CD30-mFc, die CD30-spezifischen scFv-Fc Antikörper, die humanen RNasen und die scFv-Fc-RNase Fusionsproteine wurden in HEK293 Zellen produziert. Dafür wurde die entsprechende Plasmid-DNA mit dem kationischen Transfektionsreagenz Polyethylenimin (PEI) in Transfektionsmedium vereinigt und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dieser Mischung transfiziert. Die produzierten Proteine wurden in das Kulturmedium abgegeben.

Es kamen zwei verschiedene HEK293 Zelllinien zum Einsatz. Das Antigen CD30-mFc, die scFv-Fc Antikörper und die humanen RNasen wurden mit der Zelllinie HEK293 T produziert. Die scFv-Fc-RNase Fusionsproteine wurden mit der Zelllinie HEK293 6E produziert.

Bei der adhärenz wachsenden Zelllinie HEK293 T wurden die Zellen am Tag vor der Transfektion derart gesplittet, dass die Platten am Transfektionstag maximal zu 70 % bewachsen waren. Nach der Transfektion erfolgte die Kultivierung bei 37 °C und 7 % CO₂-Begasung zunächst für 24 h in Kultivierungsmedium und wurde dann zu DMEM-Medium mit 4 % (v/v) FCS (low IgG) + 1 % P/S gewechselt. Dieses wurde täglich erneuert, wobei der abgenommene Kulturüberstand mit den produzierten Proteinen bei 4 °C gelagert wurde. Für die anschließende Reinigung wurde der Kulturüberstand 30 min bei 3200 xg und 4 °C zentrifugiert, sterilfiltriert (0,45 µm) und entgast.

Die in Suspension wachsende Zelllinie HEK293 6E wurde bei einer Zelldichte von 1,3-2,0*10⁶ Zellen/mL transfiziert. Anschließend erfolgte die Kultivierung in Erlenmeyerkolben bei 37 °C, 5 % CO₂-Begasung und 110 rpm in Kultivierungsmedium. Nach 48 h folgte eine Zufütterung von 50 % (v/v) Kultivierungsmedium sowie 0,5 % (w/v) TN1-Pepton auf das Endvolumen bezogen. Die Kultivierung wurde weitere 66 h fortgesetzt. Für die anschließende Reinigung der Proteine wurde der Kulturüberstand 30 min bei 3200 xg und 4 °C zentrifugiert, sterilfiltriert (0,45 µm) und entgast.

Die Tabelle 3-23 gibt einen Überblick über die Bedingungen bei der Transfektion und der Proteinproduktion.

Tabelle 3-23: Transfektions- und Produktionsbedingungen

Zelllinie	Plasmid-DNA	PEI (1 µg/µL)	Bedingungen
HEK293 T	10 µg in 250 µL Medium	40 µL in 250 µL Medium	Kulturschale, täglich Mediumswechsel (13 mL)
HEK293 6E	100 µg in 5 mL Medium	250 µL in 5 mL Medium	500 mL-Erlenmeyerkolben, 100 mL Medium + Fütterung von 50 mL Medium und 3,75 mL 20 %igem TN1

Viabilitätstest (MTT-Test)

Mit Hilfe des Viabilitätstests wurde der Einfluss des Antikörpers SH313-B5-hFc und der scFv-Fc-RNase Fusionsproteine auf die Viabilität von humanen Karpas299 (CD30⁺) und Jurkat (CD30⁻) Zellen untersucht. Dafür wurden 50 µL der Suspensionszellen pro Vertiefung einer 96 well Mikrotiterplatte mit einer Zelldichte von 1*10⁵ Zellen/mL in Kultivierungsmedium

eingesät. Nach 18 h Kultivierung wurden die Proteine in Endkonzentrationen von $3 \cdot 10^{-7}$ M bis $1 \cdot 10^{-12}$ M in 50 μ L Kultivierungsmedium mit den Zellen vereinigt. Als Kontrolle wurden Zellen ohne Fremdprotein eingesetzt. Der Gesamtansatz von 100 μ L enthielt maximal 10 % (v/v) Proteinlösung. Er wurde 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung inkubiert.

Anschließend wurde der Einfluss der Proteine auf die Viabilität der Zellen durch eine spezifische Farbreaktion nachgewiesen. Es wurde das Substrat 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) verwendet, das lediglich von stoffwechselaktiven Zellen umgesetzt werden kann. Es wurden 10 μ L der Substratlösung (5 mg/mL) mit den Ansätzen vereinigt und 4 h bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung inkubiert. Parallel wurde eine Verdünnungsreihe der Zellen ($1 \cdot 10^6$ bis $2 \cdot 10^3$ Zellen/mL) mit dem Substrat inkubiert, die zur Erstellung einer Kalibriergeraden zur Korrelation der Zelldichte mit der Farbintensität eingesetzt wurde. Die Reaktion wurde nach 4 h durch Zugabe von 100 μ L saurem Isopropanol abgestoppt und nach intensivem Resuspendieren die Färbung bei einer Wellenlänge von 570 nm mit dem Multiscan Spectrum Reader vermessen.

Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde die Bindung der produzierten scFv-Fc Antikörper und scFv-Fc-RNase Fusionsproteine an CD30⁺ Karpas299 Zellen untersucht. Weiterhin wurde die Internalisierung des Antikörpers SH313-B5-hFc und der scFv-Fc-RNase Fusionsproteine in die Karpas299 Zellen nachgewiesen und das Recycling des CD30 untersucht.

Bindung an CD30⁺ Lymphomzellen

Die CD30⁺ Karpas299 Suspensionszellen und die CD30⁻ Kontrollzellen Jurkat wurden für 5 min bei 500 xg und 4 °C zentrifugiert und in Kultivierungsmedium resuspendiert. Die semiadhärenten CD30⁻ HD-MY-Z Kontrollzellen wurden mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA von der Zellkulturschale gelöst. Die Zellzahl wurde mittels Trypanblaufärbung bestimmt. Jeweils $1 \cdot 10^5$ Zellen wurden in 5 mL-Röhrchen überführt und mit 3 mL Puffer gewaschen (Zentrifugation für 5 min bei 500 xg und 4 °C). Die Zellen wurden mit 100 μ L scFv-Fc Antikörpern (1 μ g/mL und 10 μ g/mL) bzw. 100 μ L scFv-Fc-RNase Fusionsprotein (10 μ g/mL) gemischt und 1 h auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit je 3 mL Puffer (Zentrifugation für 5 min bei 500 xg und 4 °C) wurden die Zellen mit 100 μ L Nachweisantikörper Ziege anti-human IgG (Fc-spezifisch) FITC-konjugiert gemischt und 1 h im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Es folgte ein zweimaliger Waschschriff mit je 3 mL Puffer (Zentrifugation für 5 min bei 500 xg und 4 °C). Die Zellen wurden in 500 μ L Puffer resuspendiert und mittels Durchflusszytometrie an einem Cytomics FC 500 bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm analysiert. Gemessen wurde die FITC-vermittelte Fluoreszenzintensität bei 525 nm (FL1). Für jede Probe wurden 10^4 Messereignisse untersucht, die mit der CXP Analysis 2.2 und der Flowjo Software ausgewertet wurden. Die

mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) wurden ermittelt. Die MFI der Proben wurden mit der MFI der Kontrolle ins Verhältnis gesetzt, um einen anschaulichen Vergleich der Bindungsstärken zu ermöglichen.

Internalisierung

Für den Nachweis der Internalisierung des Antikörpers SH313-B5-hFc und der scFv-Fc-RNase Fusionsproteine mittels Durchflusszytometrie wurden diese zunächst mit dem Farbstoff CypHer5E markiert (siehe *Markierung von Proteinen mit einem pH-sensitiven Farbstoff*).

Die Suspensionszellen Karpas299 und Jurkat wurden für 5 min bei 500 xg und RT zentrifugiert und in Kultivierungsmedium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels Trypanblaufärbung bestimmt. Jeweils $1 \cdot 10^5$ Zellen wurden mit 2 µg der markierten Proteine in Kultivierungsmedium für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend folgten ein Austausch des Mediums und eine weitere Inkubation für 23 h. Die Zellen wurden nach 1, 3, 5, 7 und 24 h direkt mittels Durchflusszytometrie an einem Cytomics FC 500 bei einer Anregungswellenlänge von 638 nm analysiert. Gemessen wurde die CypHer5E-vermittelte Fluoreszenzintensität bei 675 nm (FL4). Für jede Probe wurden 10^4 Messereignisse untersucht, die mit der CXP Analysis 2.2 und der Flowjo Software ausgewertet wurden. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) wurden ermittelt. Die MFI der Proben wurden mit der MFI der Kontrolle ins Verhältnis gesetzt, um eine zeitliche Darstellung des Internalisierungsprozesses zu ermöglichen.

Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Für den Nachweis der Internalisierung des Antikörpers SH313-B5-hFc und der scFv-Fc-RNase Fusionsproteine mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie wurden diese zunächst mit dem Farbstoff CypHer5E markiert (siehe *Markierung von Proteinen mit einem pH-sensitiven Farbstoff*).

Die Suspensionszellen Karpas299 und Jurkat wurden für 5 min bei 500 xg und RT zentrifugiert und in Kultivierungsmedium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels Neubauerzählkammer bestimmt. Jeweils $1 \cdot 10^5$ Suspensionszellen wurden in die Vertiefung einer 96 well Mikrotiterplatte gesät. Nach 18 h Kultivierung wurden die Zellen mit 2 µg der markierten Proteine in Kultivierungsmedium für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend folgten ein Austausch des Mediums und eine weitere Inkubation für 4 h. Nach einem Waschschrift mit PBS (Zentrifugation für 5 min bei 500 xg und RT) wurde die Zelllösung auf Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen überführt. Die Anhaftung der Zellen erfolgte für 30 min bei RT. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen durch 3,7 %iges Formaldehyd für 20 min bei RT fixiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellkerne mittels 30 µL DAPI-Lösung (100 µg/mL) für 1 min bei RT gefärbt.

Die Deckgläschen wurden zweimal mit PBS und einmal mit dH₂O gewaschen und mit 10 µL Mowiol/Dabco auf dem Objektträger fixiert. Die Trocknung fand ü.N. bei RT statt.

Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie wurde mit einem LSM 510 META durchgeführt. Es wurde für die Darstellung der Zellkerne (DAPI) ein Laser mit 364 nm Wellenlänge und für die Darstellung der Internalisierung (CypHer5E) ein Laser mit 633 nm Wellenlänge verwendet. Alle Bilder wurden mit der Software ImageJ ausgewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Humane RNasen

Die humane RNase A Superfamilie umfasst 13 Mitglieder, von denen acht eine ribonukleolytische Aktivität aufweisen [18]. Diese acht aktiven RNasen sollten rekombinant produziert und gereinigt werden, um sie hinsichtlich der ribonukleolytischen Aktivität und deren Inhibition durch den humanen RI charakterisieren zu können.

4.1.1 Isolierung des Gens der humanen RNase8

Das Gen der RNase8 wurde mittels PCR aus humaner PBMC-cDNA isoliert und in den Vektor pGEM-T[®] Easy integriert. Die Gene der RNasen 2, 3 und 7 wurden in dem Vektor pCR2.1, die der RNasen 1, 4, 5 und 6 in dem Vektor pDONR223 zur Verfügung gestellt.

4.1.2 Konstruktion von RNase-Expressionsvektoren

Für die Produktion der RNasen 1-8 kamen drei verschiedene Expressionsansätze zum Einsatz (Abbildung 4-1). Die ersten beiden Konstrukte basierten auf dem Säugerzell-Expressionsvektor pCMV2.5-hIgG1-Fc-XP, in dem die Gensequenz des humanen Fc-Teils deletiert wurde. Diese beiden RNase-Konstrukte unterschieden sich in ihrem Sekretions-signalpeptid. Es wurde zum Einen das RNase-eigene Sekretionspeptid (Wildtyp, wt) und zum Anderen ein murines Immunglobulin Sekretionspeptid (Ig) verwendet.

Das dritte Konstrukt basierte auf dem Vektor pYD5-XbaI, der eine Expression von Fusionsproteinen aus humanem Fc-Teil und RNase ermöglichte. Der N-terminale Fc-Teil mit murinem Immunglobulin Signalpeptid sollte bei diesem Konstrukt eine Sekretion fördern und eine effiziente Reinigung des Fusionsproteins mittels Protein A Affinitätschromatographie ermöglichen. Zwischen dem Fc-Teil und der RNase befand sich für eine anschließende Spaltung der RNase vom Fc-Teil eine *Tobacco Etch Virus* (TEV)-Proteaseschnittstelle (TEV_{cs}).

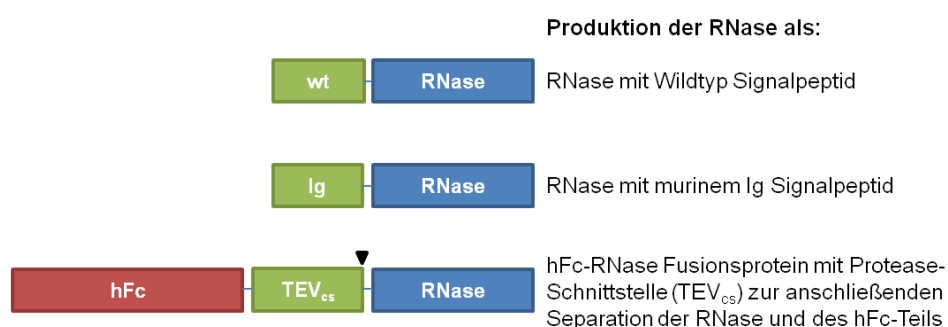


Abbildung 4-1: Schematische Übersicht über die verschiedenen Ansätze zur Produktion der RNasen 1-8
Die Spaltstelle der TEV_{cs} ist durch ▼ gekennzeichnet.

4.1.3 Produktion und Reinigung humaner RNasen

Produktion von RNasen mit verschiedenen sekretorischen Signalpeptiden

Die Produktion der RNase1 wurde in HEK293 T Zellen durchgeführt. Die Sekretion in das Kulturmedium sollte durch das murine Ig Signalpeptid (Ig_RN1) bzw. das Wildtyp Signalpeptid (wt_RN1) gewährleistet werden. Nach der Reinigung mittels Ionenaustauschchromatographie wurde die sekretorische Produktion durch eine SDS-PAGE mit Coomassiefärbung und einen Western Blot mit Immunfärbung nachgewiesen (Abbildung 4-2).

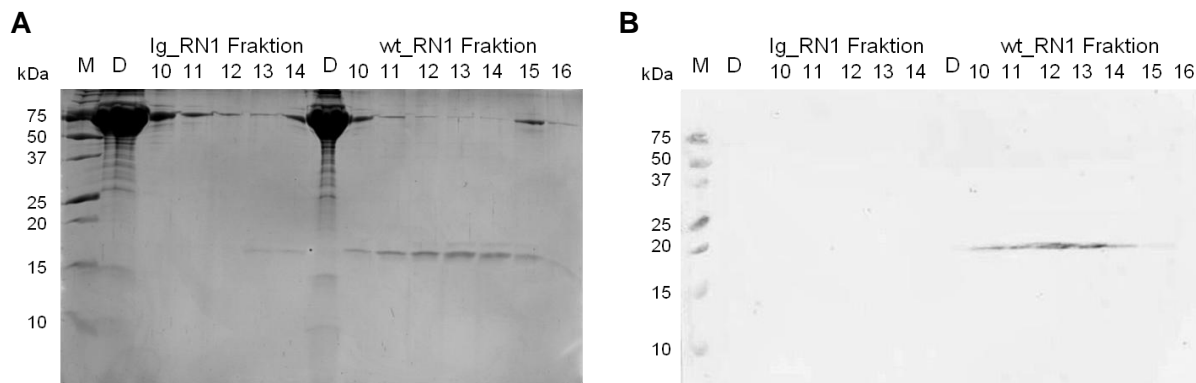


Abbildung 4-2: Analyse der produzierten RNase1 mittels SDS-PAGE und Immunfärbung

Coomassiegefärbtes, 18 %iges SDS-Gel der humanen RNase1. Aufgetragen sind jeweils 10 µL der Elutionsfraktionen nach der Reinigung mittels Ionenaustauschchromatographie mit der Säule HiTrap SP XL (A). Immunfärbung zum Nachweis der Produktion und Reinigung der humanen RNase1. Aufgetragen sind 10 µL der Elutionsfraktionen nach der Reinigung mittels Ionenaustauschchromatographie. Der Nachweis erfolgte durch ein affinitätsgereinigtes Kaninchen anti-humane-RNase1 Serum und einen Ziege anti-Kaninchen IgG AP-konjugierten Antikörper und NBT/BCIP-Substrat (B). (M: Marker; D: Durchlauf)

Die Produktion und Sekretion in das Kulturmedium war für den Ansatz mit dem Wildtyp Signalpeptid (wt_RN1) erfolgreich. Dies konnte in dem SDS-Gel in den Fraktionen 10-15 durch die Proteinbanden bei ~17 kDa nachgewiesen werden, welches der molekularen Masse der RNase1 entspricht. Die Reinigung war effektiv, da für den Durchlauf (D) keine RNasebande bei ~17 kDa nachgewiesen werden konnte. Dennoch konnten in einigen Fraktionen zusätzliche Banden bei ~75 kDa detektiert werden, bei denen es sich um Verunreinigungen durch im Kulturmedium enthaltene bovine Serumproteine handelte (Abbildung 4-2 A). Durch die RNase1-spezifische Immunfärbung wurde die erfolgreiche sekretorische Produktion der wt-RNase1 bestätigt (Abbildung 4-2 B).

Die Reinigungsfraktionen 13 und 14 der Produktion mit dem murinen Ig Signalpeptid (Ig_RN1) wiesen Spuren von RNase auf (Abbildung 4-2 A), die aber mittels Immunfärbung nicht nachgewiesen werden konnten (Abbildung 4-2 B). Dieser Expressionsansatz wurde deshalb nicht weiter verfolgt.

Die RNasen 2-8 wurden anschließend nur mit ihrem jeweiligen Wildtyp Signalpeptid produziert und mittels Ionenaustauschchromatographie gereinigt. Die Analyse der jeweiligen Hauptelutionsfraktion der Reinigung geschah mittels SDS-PAGE und Silberfärbung. Als Kontrolle (K) wurde frisches Kulturmedium auf die gleiche Weise gereinigt und analysiert (Abbildung 4-3).

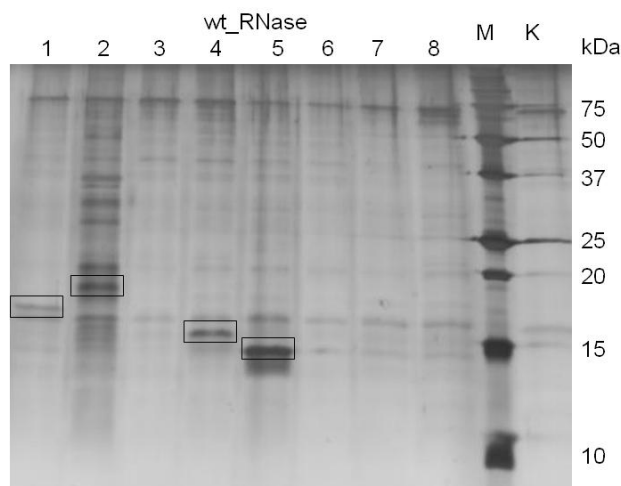


Abbildung 4-3: Analyse der RNasen 1-8 mittels SDS-PAGE

Silbergefärbtes, 18 %iges SDS-Gel der produzierten und gereinigten humanen wt_RNasen1-8. Aufgetragen sind 10 µL der jeweiligen Hauptelutionsfraktion nach der Reinigung mittels Ionenaustauschchromatographie mit der Säule HiTrap SP XL. Die Banden der erfolgreich produzierten und gereinigten RNasen sind durch Kästen markiert. (M: Marker, K: Kontrolle, gereinigtes Kulturmedium)

Für die RNasen 1, 2, 4 und 5 war die sekretorische Produktion und Reinigung erfolgreich. In dem silbergefärbten SDS-Gel konnten Proteine mit den erwarteten molekularen Massen von ~15-17 kDa nachgewiesen werden. Durch zusätzliche Banden in allen Spuren wurde deutlich, dass Verunreinigungen in den Proben enthalten waren und folglich die Reinigungen nicht sehr effektiv waren. Dies war besonders bei der RNase2 der Fall. Die RNasen 1, 2, 4 und 5 konnten für weitere Versuche nicht eingesetzt werden, da aufgrund der geringen Ausbeuten keine Quantifizierung möglich war. Die RNasen 3, 6, 7 und 8 wurden entweder nicht sekretorisch produziert oder konnten mittels Ionenaustauschchromatographie nicht gereinigt werden.

Produktion von hFc-TEV_{cs}-RNase Fusionsproteinen und Spaltung mittels TEV-Protease

Zur Optimierung der sekretorischen Produktion der RNasen 1-8 wurde eine alternative Strategie verwendet. Es wurden Fusionsproteine aus dem humanem IgG1-Fc-Teil und der RNase in HEK293 T Zellen produziert (hFc-TEV_{cs}-RNase) und mittels Protein A Affinitätschromatographie gereinigt. Dies war für alle acht RNasen erfolgreich. Anschließend wurden die RNasen durch einen proteolytischen Verdau mit TEV-Protease von dem Fc-Teil gespalten. Das Ergebnis des 16-stündigen Verdaus wurde mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 4-4).

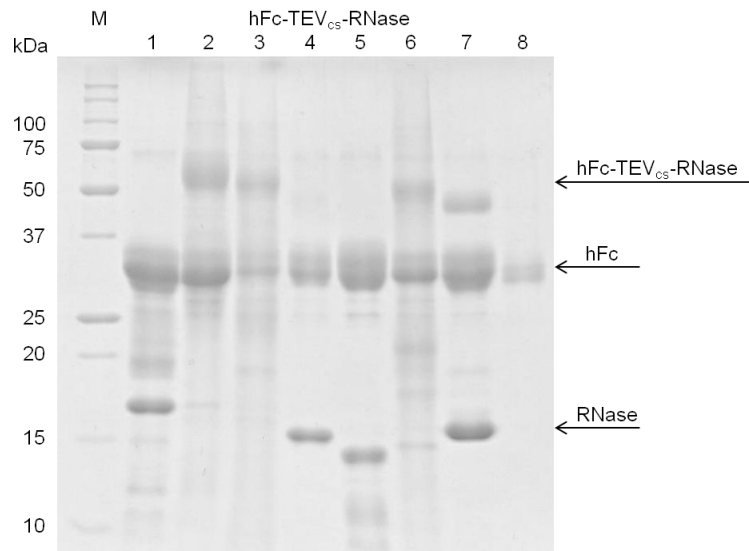


Abbildung 4-4: Proteolytische Spaltung der RNasen 1-8 vom hFc-Teil mittels TEV-Protease

Coomassiegefärbtes, 15 %iges SDS-Gel der Verdauansätze der Fusionsproteine hFc-TEV_{cs}-RNasen 1-8 nach 16 h Inkubation bei 30 °C mit TEV-Protease. Aufgetragen sind 5 µL der Ansätze. (M: Marker; Pfeile kennzeichnen den erwarteten Größenbereich der Proteine bzw. Proteinfragmente)

Der proteolytische Verdau mit der TEV-Protease war für die Fusionsproteine mit RNase 1, 4, 5 und 7 erfolgreich. Für diese vier RNasen konnten in dem SDS-Gel Proteine mit den erwarteten Molekulargewichten der RNasen (~15-17 kDa) und des humanen Fc-Teils (~30 kDa) nachgewiesen werden. Die Spaltung des Fusionsproteins mit RNase 7 war unvollständig, da noch ungespaltenes Protein (~50 kDa) detektiert wurde. Die Fusionsproteine mit den RNasen 2, 3 und 6 wurden ineffizient gespalten. Es konnten Proteine mit den Molekulargewichten der ungespaltenen Fusionsproteine (~50-60 kDa) und des humanen Fc-Teils (~30 kDa) sowie Spuren mehrerer Proteine mit Molekulargewichten < 30 kDa nachgewiesen werden. Die kleinen Proteine konnten aber nicht eindeutig den RNasen zugeordnet werden. Für das Fusionsprotein mit RNase 8 konnte trotz vollständiger Proteolyse keine RNasebande nachgewiesen werden.

Eine erneute Zugabe von TEV-Protease und eine weitere Inkubation bei 30 °C ü.N. führten zu keiner weiteren Abspaltung der RNasen 2, 3, 6 und 7 von dem humanen Fc-Teil (nicht gezeigt). Der humane Fc-Teil und die hFc-TEV_{cs}-RNase Fusionsproteine wurden mittels Western Blot und Immunfärbung identifiziert (nicht gezeigt).

Nach der Proteolyse ermöglichte eine präparative Größenausschlusschromatographie die Separation der RNasen 1, 4, 5 und 7 von dem hFc-Teil und der Protease. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot mit Immunfärbung analysiert (beispielhaft RNase 1: Abbildung 4-5).

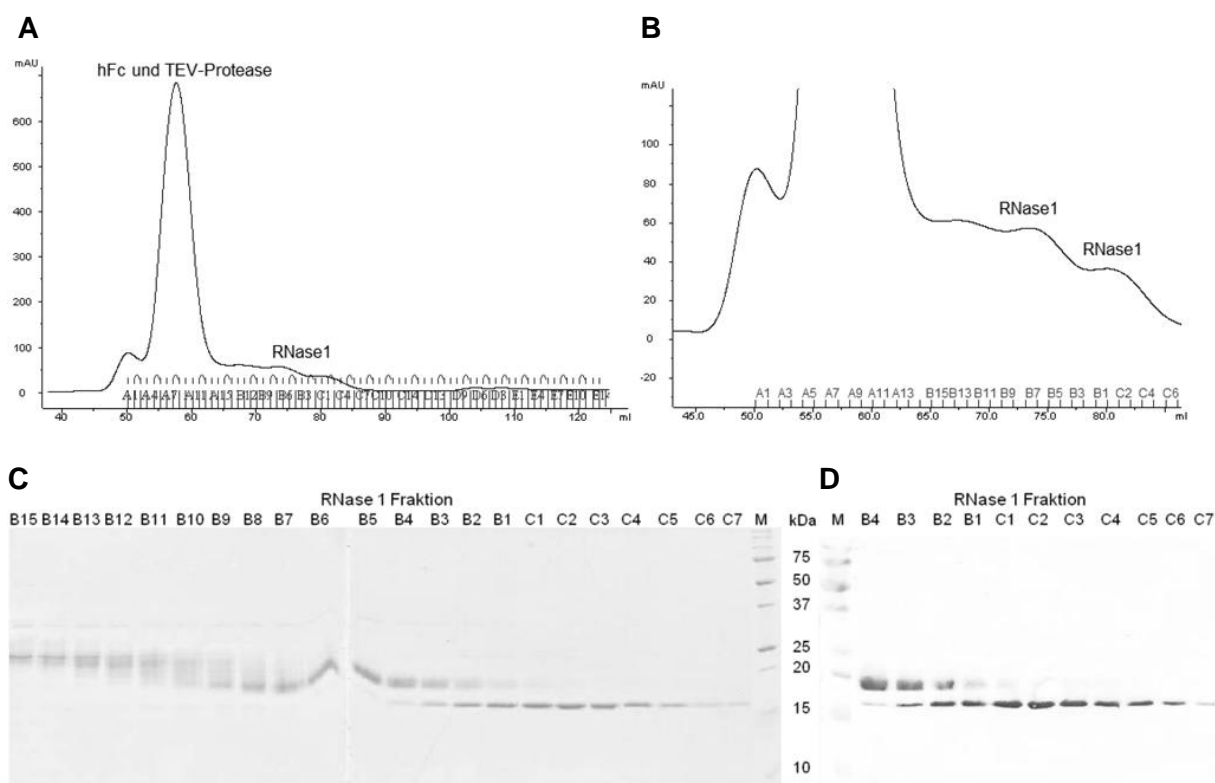


Abbildung 4-5: Reinigung am Beispiel der RNase1

Separation der RNase1 von dem hFc-Teil und der TEV-Protease mittels präparativer Größenausschlusschromatographie. Es wurde die Säule HiLoad16-60 Superdex75 und eine Flussrate von 0,5 mL/min verwendet. Gesamtes Chromatogramm (A); Elutionspeaks (B); Coomassiegefärbtes, 15%iges SDS-Gel der Elutionsfraktionen; aufgetragen sind 15 µL der Elutionsfraktionen (C); Western Blot und Immunfärbung zum spezifischen Nachweis der RNase1. Aufgetragen sind 15 µL der Elutionsfraktion. Der Nachweis erfolgte durch ein affinitäts-gereinigtes Kaninchen anti-humane-RNase1 Serum und einen Ziege anti-Kaninchen IgG (AP-konjugierten) Antikörper und NBT/BCIP-Substrat (D). (M: Marker)

Die Reinigungen der RNasen 1, 4, 5 und 7 mittels Größenausschlusschromatographie waren erfolgreich. Für die RNase1 wurden zwei Elutionspeaks mit unterschiedlichen apparenten molekularen Massen erhalten, die mittels Immunfärbung beide als humane RNase1 identifiziert wurden. Für die RNasen 4, 5 und 7 wurde jeweils nur ein Elutionspeak erhalten (nicht gezeigt). Die sauberen Elutionsfraktionen mit vergleichbarer Bandenintensität im SDS-Gel wurden vereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Die Konzentrationen der Fraktionen wurden geldensitometrisch bestimmt und reichten je nach RNase von ~15 µg/mL bis ~440 µg/mL (Hauptfraktionen, Tabelle 4-1).

Tabelle 4-1: Geldensitometrische Quantifizierung der gereinigten RNasen 1, 4, 5 und 7

RNase	vereinigte Fraktionen	Konzentration [µg/mL]
1	C2-C3	70
4	D10-D11	15
5	D7-D12	101
7	C7-C11	437

4.1.4 Bestimmung der RNaseaktivität

Die ribonukleolytische Aktivität der RNasen 1, 4, 5 und 7 wurde gegenüber den zwei Substraten 6-FAM-dA-rC-dAdA-6-BHQ1 bzw. 6-FAM-dA-rU-dAdA-6-BHQ1 ermittelt, die aus einem DNA-Rückgrat (dA)₃ mit einem einzelnen Nukleosid Cytidin (rC) oder Uridin (rU) bestehen. Die Spaltung des jeweiligen Substrates durch die RNasen geschieht spezifisch hinter dem Cytidin bzw. Uridin und führt zu einer Fluoreszenzzunahme.

Die einzusetzenden Konzentrationen der RNasen wurden für diesen Test so gewählt, dass innerhalb von wenigen Stunden das Ende der Reaktion mit einem konstanten Fluoreszenzwert erreicht wurde und der Kurvenverlauf gleichzeitig ein genaues Auslesen der Anfangssteigung gewährleistete. Anhand dieser Steigung, des Endwertes und der RNasekonzentration wurde die Enzymeffizienz k_{cat}/K_M ermittelt. Dieser Wert ist konzentrationsunabhängig und ermöglicht einen Vergleich der RNaseaktivitäten untereinander.

In Abbildung 4-6 ist beispielhaft das Ergebnis eines RNase-Aktivitätstests mit RNase7 und dem Substrat C (6-FAM-dA-rC-dAdA-6-BHQ1) dargestellt. Die Umsetzung des Substrates durch die eingesetzte Konzentration an RNase7 führte bereits nach ~1000 s zu dem Maximalwert des Fluoreszenzsignals von ~28000. Zur Ermittlung der Anfangssteigung wurde eine lineare Regression durchgeführt. Die Negativkontrolle wies keine Fluoreszenzzunahme auf, so dass Verunreinigungen durch ubiquitär vorkommende RNasen ausgeschlossen werden konnten.

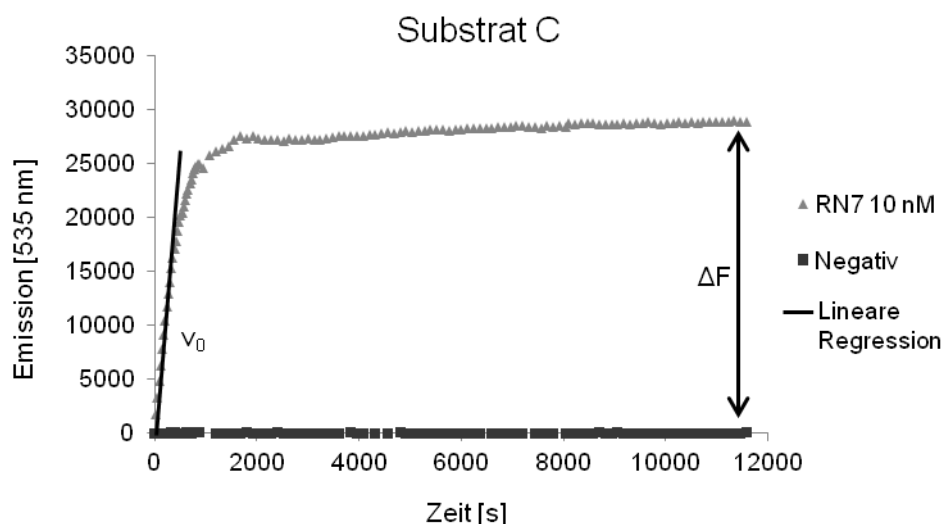


Abbildung 4-6: Aktivitätstest am Beispiel der RNase7

RNase-Aktivitätstest für die humane RNase7 mit dem Substrat C (6-FAM-dA-rC-dAdA-6-BHQ1). Es wurden 10 nM RNase7 und 5 nM Substrat in einem Gesamtansatz von 200 µL in MES-Puffer eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde ein paralleler Ansatz ohne Zugabe von RNase vermessen. Es wurden jeweils Triplikate untersucht. Die Messung erfolgte in 30 Zyklen à 30 s und weiteren 60 Zyklen à 120 s. Die Anfangssteigung wurde mittels linearer Regression und der Endwert durch Bildung des Mittelwertes der letzten Messwerte ermittelt. Mit Gleichung 2 wurde die Enzymeffizienz k_{cat}/K_M berechnet.

Die eingesetzten RNasekonzentrationen wurden für die Berechnung der Enzymeffizienzen herangezogen. Es ergaben sich für die RNasen 1, 4, 5 und 7 die in Tabelle 4-2 aufgelisteten Werte für die Enzymeffizienzen k_{cat}/K_M und die Präferenzen für eines der verwendeten Nukleoside Cytidin oder Uridin.

Tabelle 4-2: Ermittelte k_{cat}/K_M -Werte der RNasen 1, 4, 5 und 7

RNase	k_{cat}/K_M [$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$] Substrat U	k_{cat}/K_M [$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$] Substrat C	Präferenz
1	$2,0 \cdot 10^7$	$1,9 \cdot 10^7$	-
4	$2,3 \cdot 10^6$	$8,7 \cdot 10^5$	U
5	$9,4 \cdot 10^4$	$3,7 \cdot 10^4$	U
7	$4,1 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^5$	C

Aktivitäten mit Präferenz für eines der beiden Substrate sind fett hervorgehoben.

Die größte ribonukleolytische Aktivität wurde für RNase1 nachgewiesen. Die Enzymeffizienz war für beide Substrate $\sim 2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, so dass keine Präferenz für eines der beiden Pyrimidine ermittelt werden konnte. Die anderen drei RNasen hatten niedrigere Aktivitäten, wiesen aber teils stark ausgeprägte Präferenzen für eines der beiden Pyrimidine auf. Sowohl für RNase4 als auch für RNase5 konnte eine Präferenz für Uridin detektiert werden, während die RNase7 eine ausgeprägte Cytidin-Präferenz aufwies.

4.1.5 Inhibition der RNaseaktivität durch den RNase-Inhibitor

Die Existenz des RI im Zytoplasma humaner Zellen verhindert den Abbau zellulärer RNA durch eindringende RNasen. Die Hemmung der ribonukleolytischen Aktivität wird durch eine nichtkovalente 1:1-Bindung des RI an die RNase mit einer extrem hohen Affinität von bis zu 10^{-15} M verursacht [89].

Die Inhibition der RNaseaktivität wurde durch Zugabe von RI in bis zu 20-fachem molarem Überschuss mittels RNase-Aktivitätstest untersucht. Als Referenz wurde die Aktivität ohne RI auf 100 % festgelegt. Die Abbildung 4-7 veranschaulicht den Inhibitionsgrad der Aktivität der RNasen 1, 4, 5 und 7 durch den RI.

Die RNase1-Aktivität wurde durch den humanen RI kaum gehemmt. Auch bei einem 20-fachen molaren Überschuss an RI war noch über 80 % der Aktivität erhalten. Die Aktivität der RNase4 wurde durch den RI deutlich inhibiert. Bei einem 20-fachen molaren Überschuss fand eine vollständige Hemmung statt. Für RNase7 konnte eine Hemmung, aber kein vollständiger Aktivitätsverlust nachgewiesen werden. Für die RNase5 wurde deutlich, dass eine 1:1-Bindung des Inhibitors an die RNase stattfindet. Bei einer Zugabe von RI in äquimolarer Konzentration war bereits keine Aktivität mehr messbar. Wurde weniger RI eingesetzt (10 % bzw. 50 % der RNasekonzentration), entsprach der Anteil des Aktivitätsverlusts genau dem zugegebenen Anteil an Inhibitor.

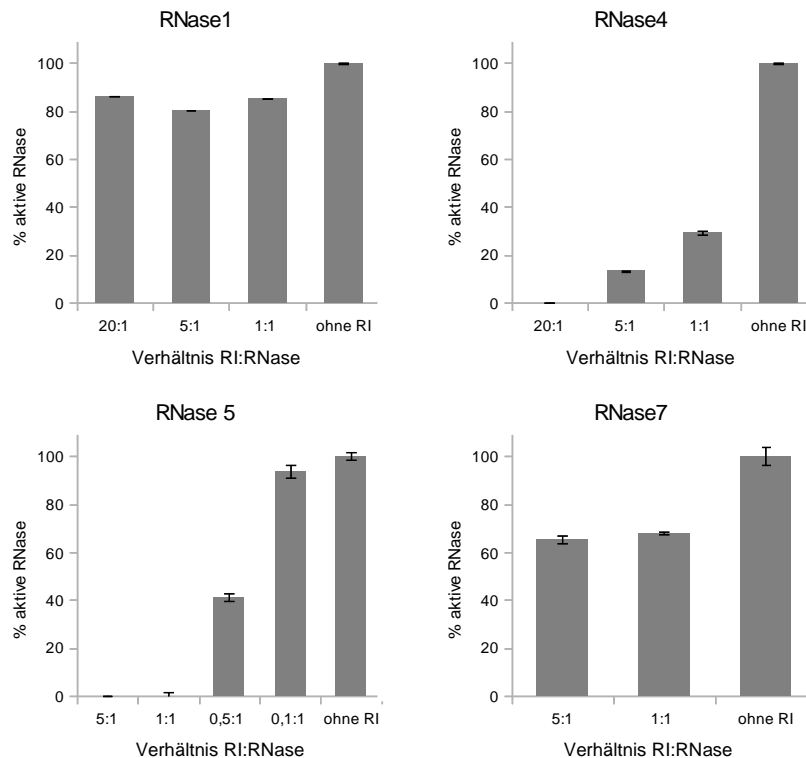


Abbildung 4-7: Inhibition der RNaseaktivität von RNase 1, 4, 5 und 7 durch den RI
Bestimmung des Inhibitionsgrades der RNaseaktivität durch den humanen RI für die RNasen 1, 4, 5 und 7. Die jeweilige RNase wurde ohne RI und mit Zugabe von bis zu 20-fachem molarem Überschuss an RI eingesetzt. Es wurden die optimalen RNasekonzentrationen und 5 nM Substrat in einem Gesamtansatz von 200 µL in MES-Puffer eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde ein paralleler Ansatz ohne Zugabe von RNase vermessen. Es wurden jeweils Triplikate untersucht. Die Messung erfolgte in 30 Zyklen à 30 s und weiteren 60 Zyklen à 120 s. Für die Auswertung wurde der jeweilige Ansatz ohne RI als 100 % Aktivität festgesetzt.

4.1.6 Übersicht über die Eigenschaften der RNasen

Die RNase1 wies für den Einsatz in ImmunRNasen durchgängig die besten Eigenschaften auf. Eine Produktion war sowohl alleine als auch als Fusionsprotein möglich. Weiterhin wies sie die höchste RNaseaktivität auf, die aber von dem humanen RI nicht vollständig gehemmt wurde. Die RNasen 2-8 ließen sich ebenfalls teilweise alleine produzieren, während eine Produktion als Fusionsprotein für alle erfolgreich war. Die Spaltung der RNasen 2, 3, 6 und 8 von dem hFc-Teil führte nicht zu einer ausreichenden Konzentration an reiner RNase, so dass für diese RNasen keine Analysen zur ribonukleolytischen Aktivität und der Hemmung dieser durch den humanen RI durchgeführt werden konnten. Da die Produktion als Fusionsprotein für alle acht RNasen möglich war, wurden nach der Charakterisierung der Antikörper für die ImmunRNasen alle acht RNasen eingesetzt.

Die Tabelle 4-3 gibt eine Übersicht über die ermittelten Eigenschaften der RNasen.

Tabelle 4-3: Zusammenfassung der Eigenschaften der RNasen

Eigenschaft	RN1	RN2	RN3	RN4	RN5	RN6	RN7	RN8
¹ Produktion als wt_RNase	+	+	-	+	+	-	-	-
² Produktion als hFc-TEV _{cs} -RNase Fusionsprotein	+	+	+	+	+	+	+	+
³ Abspaltung vom hFc mittels Proteolyse	+	-	-	+	+	-	+	-
⁴ RNaseaktivität	+++	n. b.	n. b.	++	+	n. b.	+	n. b.
⁵ Inhibition durch den RI	-	n. b.	n. b.	++	+++	n. b.	+	n. b.

(n.b.: nicht bestimmt)

¹ - keine sekretorische Produktion und/oder Reinigung möglich; + sekretorische Produktion und/oder Reinigung mit geringen Ausbeuten möglich

² + Produktion und Protein A-Reinigung erfolgreich

³ - Reinigung erreichte keine ausreichende Konzentration an reiner RNase; + Reinigung erreichte hohe Konzentration an reiner RNase

⁴ + 10^4 - 10^5 M⁻¹ s⁻¹; ++ 10^5 - 10^6 M⁻¹ s⁻¹; +++ 10^7 M⁻¹ s⁻¹

⁵ - keine eindeutige Hemmung; + keine vollständige Hemmung bei 5-fachem molaren Überschuss an RI; ++ vollständige Hemmung bei 20-fachem molaren Überschuss an RI; +++ vollständige Hemmung bei äquimolarer Menge an RI

4.2 Antigen CD30

Das Antigen CD30 wurde für die Charakterisierung der CD30-spezifischen Antikörper rekombinant hergestellt. Da für die Analyse der antikörperspezifischen Eigenschaften nur der extrazelluläre Teil des Tumormarkers CD30 von Bedeutung war, wurde nur dieser in den Vektor pCMV-mIgG1-Fc-XP kloniert. Das Antigen wurde dadurch an den murinen IgG1-Fc-Teil fusioniert. Dies sollte Kreuzreaktionen mit Nachweisantikörpern des humanen Fc-Teils in den folgenden Analysen mit den CD30-spezifischen scFv-hFc Antikörpern verhindern. Weiterhin ermöglichte der Fc-Teil eine Reinigung mittels Protein A Affinitätschromatographie.

4.2.1 Produktion und Reinigung von rekombinantem CD30-mFc

Der extrazelluläre Teil des Antigens CD30 wurde als Fusionsprotein mit dem mFc-Teil in HEK293 T Zellen exprimiert. Das Fusionsprotein wurde mittels Protein A Affinitätschromatographie aus dem Zellkulturüberstand der Produktion gereinigt und mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 4-8 und Abbildung 4-9).

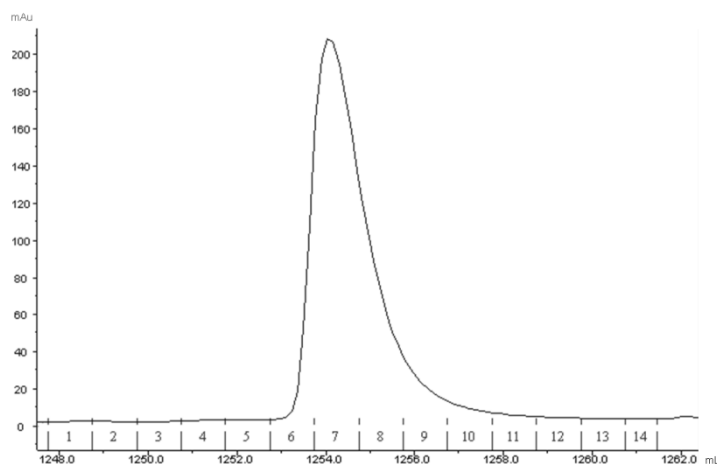


Abbildung 4-8: Reinigung des Antigens CD30-mFc

Reinigung des Antigens CD30-mFc mittels Protein A Affinitätschromatographie mit der Chromatographiesäule HiTrap™ rProtein A FF. Die Elution erfolgte mit 100 % Elutionspuffer. Dargestellt sind die Elutionsfraktionen der Reinigung.

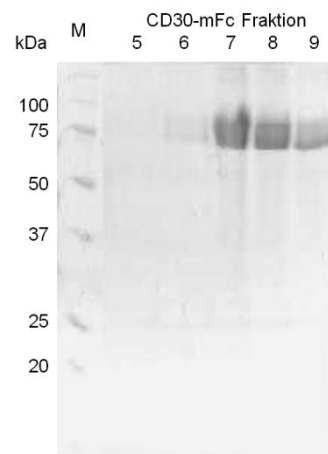


Abbildung 4-9: SDS-PAGE des Antigens CD30-mFc

Coomassiegefärbtes, 12 %iges SDS-Gel des rekombinanten Antigens CD30-mFc. Aufgetragen wurden jeweils 10 µL der Elutionsfraktionen 5-9 der Protein A Reinigung. (M: Marker)

Die Produktion des Antigens CD30-mFc war erfolgreich. Die Reinigung war effektiv, aber mit Verlusten verbunden. Das Protein hat unter reduzierenden Bedingungen eine apparente molekulare Masse von ~75 kDa. Aufgrund von heterogenen Glykosylierungen war die Proteinbande im SDS-Gel breit verschmiert. Es konnten keine Verunreinigungen nachgewiesen werden. Die Elutionsfraktionen 7-9 enthielten den Großteil des Proteins (Abbildung 4-9) und wurden vereinigt. Die geldensitometrische Quantifizierung ergab eine Konzentration von ~600 µg/mL und die volumetrische Ausbeute betrug ~15 mg/L. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

4.3 CD30-spezifische Antikörper

Die CD30-spezifischen Antikörper SH313-B5, -F9, -G9 und -H4 wurden aus den humanen naiven scFv-Genbibliotheken HAL4 und HAL7 mittels Antikörperphagendisplay gegen die extrazelluläre Domäne des Antigens CD30 isoliert (nicht gezeigt, Durchführung durch SH) [90]. Für das Panning wurde eine Mischung der Bibliotheken HAL4 und HAL7 mit einem Antikörperphagen-Titer von $1 \cdot 10^{12}$ cfu eingesetzt.

Die CD30-spezifischen Antikörper sollten im Hinblick auf ihre Eignung als *Targeting*-Domäne für ImmunRNasen produziert und charakterisiert werden. Zum Vergleich wurde der CD30-spezifische Antikörper 4E3 verwendet. Dieser Antikörper stammt aus der semi-synthetischen scFv-Genbibliothek Tomlinson I/J (MRC HGMP Resource Centre) und wurde in vorangegangenen Arbeiten bereits in ImmunRNasen mit der humanen RNase1 als Effektordomäne eingesetzt [57, 76].

Die scFv-Gene wurden von dem Phagemid-Vektor pHAL14 in den *E. coli*-Expressionsvektor pOPE101-XP und den Säugerzell-Expressionsvektor pCMV2.5-hIgG1-Fc-XP kloniert.

4.3.1 Produktion und Reinigung von Antikörpern

Die scFv-Fragmente in pOPE101-XP wurden im 250 mL-Maßstab in Schüttelkolben in *E. coli* XL1-Blue MRF' Zellen produziert. Die Reinigung der scFv-Fragmente wurde über den His-tag mittels IMAC im Batch-Verfahren durchgeführt. Je nach Antikörper wurden Konzentrationen von 50 µg/mL bis 150 µg/mL erreicht.

Die scFv-Fc Antikörper in pCMV2.5-hIgG1-Fc-XP wurden in HEK293 T Zellen produziert und mittels Protein A Affinitätschromatographie gereinigt. Die Konzentrationen betrugen je nach Antikörper zwischen 760 µg/mL und 2200 µg/mL.

Die volumetrischen Ausbeuten sind in Tabelle 4-4 zusammengefasst. Nach der geldensitometrischen Konzentrationsbestimmung wurden die Proteine bei -20 °C (scFv-Fragmente) bzw. 4 °C (scFv-Fc Antikörper) bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Parallel wurden der CD30-spezifische Kontrollantikörper 4E3 und der nicht-CD30-spezifische Kontrollantikörper MS112-IIB1 als scFv-Fragment und scFv-Fc Antikörper produziert [76, 85].

Tabelle 4-4: Volumetrische Ausbeuten der CD30-spezifischen Antikörper

Antikörper	scFv-Fragment [mg/L]	scFv-Fc Antikörper [mg/L]
SH313-B5	1,3	22,1
SH313-F9	0,9	36,1
SH313-G9	1,8	15,9
SH313-H4	1,8	23,5
4E3	0,6	46,1

4.3.2 Bindung an rekombinantes Antigen CD30-mFc im ELISA

Die produzierten CD30-spezifischen Antikörper SH313-B5, -F9, -G9 und -H4 sollten auf ihre Spezifität für das rekombinante Antigen CD30-mFc überprüft werden. Es wurde ein Antigen-ELISA mit den monovalenten scFv-Fragmenten und ein Titrations-ELISA mit den bivalenten scFv-Fc Antikörpern zur Abschätzung der Antigenbindungsstärke durchgeführt. Für letzteren wurden die Antikörperkonzentrationen variiert.

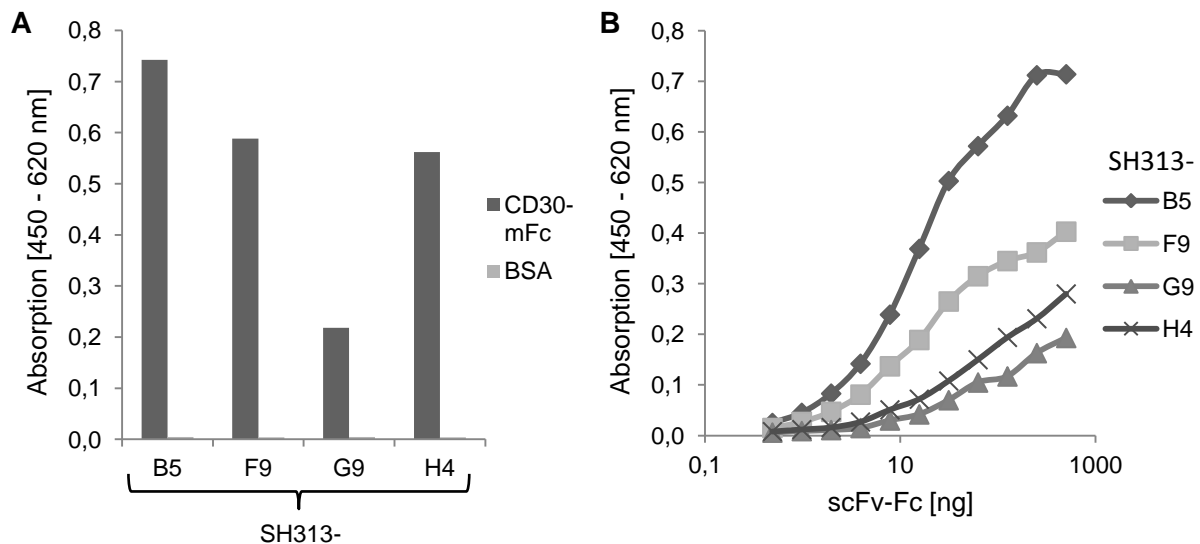


Abbildung 4-10: Bindung der monovalenten scFv-Fragmente (A) und bivalenten scFv-Fc Antikörper (B) an das rekombinante Antigen CD30-mFc (Antigen- und Titrations-ELISA)

ELISA zur Überprüfung der Spezifität der produzierten CD30-spezifischen **scFv-Fragmente** für das rekombinante Antigen CD30-mFc. Jeweils 1 µg/well CD30-mFc bzw. BSA als Kontrolle wurden immobilisiert und mit jeweils 1 µg scFv-Fragment inkubiert. Der Nachweis erfolgte über einen Maus anti-C-Myc-tag Antikörper und einen Ziege anti-Maus IgG (Fab-spezifischen) HRP-konjugierten Antikörper und TMB-Substrat (A). ELISA zur Überprüfung der Bindung der produzierten **scFv-Fc Antikörper** an das rekombinante Antigen CD30-mFc. Es wurden 100 ng/well CD30-mFc immobilisiert und mit 0,5 bis 500 ng scFv-Fc Antikörpern inkubiert. Der Nachweis erfolgte über einen Ziege anti-Human IgG (Fc-spezifischen) HRP-konjugierten Antikörper und TMB-Substrat (B).

Die vier Antikörper banden spezifisch an das rekombinante Protein CD30-mFc, welches die extrazelluläre Domäne des Antigens CD30 enthielt. Es konnte keine unspezifische Bindung an BSA nachgewiesen werden. Die stärkste Bindung wies der Antikörper SH313-B5 auf, während SH313-G9 viermal schwächer an das Antigen band. Die ELISA-Ergebnisse für die scFv-Fragmente (Abbildung 4-10 A) und die scFv-Fc Antikörper (Abbildung 4-10 B) korrelierten miteinander.

4.3.3 Bindung an rekombinantes CD30-mFc im Western Blot

Die Bindung der Antikörper an das rekombinante Antigen CD30-mFc wurde mittels Western Blot und Immunfärbung nachgewiesen. Es sollte untersucht werden, ob die Antikörper ein lineares oder ein konformationelles Epitop erkennen. Dafür wurde das Antigen entweder unter reduzierenden Bedingungen (Aufkochen bei 95 °C) oder unter nicht-reduzierenden Bedingungen (Erhitzen bei 56 °C) behandelt und die Bindung der Antikörper untersucht.

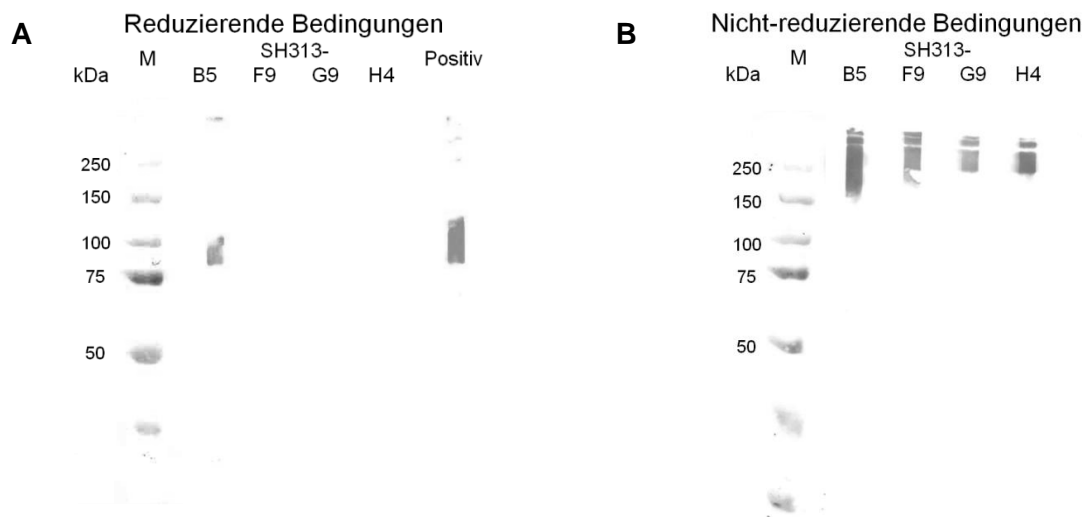


Abbildung 4-11: Immunfärbung zur Bestimmung der Art des erkannten Epitops der Antikörper

Nachweis der Bindung der CD30-spezifischen scFv-Fc Antikörper an rekombinantes CD30-mFc mittels Western Blot und Immunfärbung. Reduzierende Bedingungen (**A**) bzw. nicht-reduzierende Bedingungen (**B**). Es wurden jeweils 1 µg des Antigens CD30-mFc bei 95 °C (**A**) bzw. 56 °C (**B**) behandelt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. 500 ng der scFv-Fc Antikörper wurden eingesetzt. Der Nachweis erfolgte durch einen Ziege anti-Human IgG (Fc-spezifischen) AP-konjugierten Antikörper und NBT/BCIP-Substrat.

Für die vier untersuchten scFv-Fc Antikörper SH313-B5, -F9, -G9 und -H4 konnten Banden mit dem Molekulargewicht des nicht-reduzierten Antigens von ~250 kDa nachgewiesen werden (Abbildung 4-11 B). Für den Antikörper SH313-B5 konnte zusätzlich eine Bande mit der erwarteten molekularen Masse des reduzierten, linearisierten Antigens von ~75 kDa detektiert werden (Abbildung 4-11 A). Der Antikörper SH313-B5 erkannte somit ein lineares Epitop, während die Epitope der drei Antikörper SH313-F9, -G9 und -H4 durch das Aufkochen des Antigens unter reduzierenden Bedingungen zerstört wurden.

4.3.4 Bestimmung der Dimer- und Multimerbildung der scFv-Fragmente mittels Größenausschlusschromatographie

Die Bildung von Dimeren und Multimeren hat einen großen Einfluss auf die Bindungseigenschaften der Antikörper und sollte deswegen mittels analytischer Größenausschlusschromatographie für die CD30-spezifischen scFv-Fragmente analysiert werden.

Die drei untersuchten scFv-Fragmente SH313-B5, -F9 und -H4 wiesen neben einem großen Anteil an Monomeren in vergleichbarem Maße auch Dimere und Multimere auf (Abbildung 4-12).

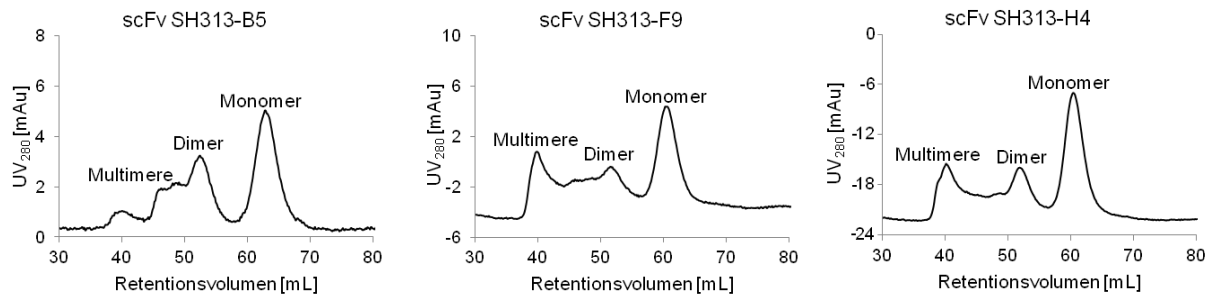


Abbildung 4-12: Bestimmung der Dimer- und Multimerbildung der scFv-Fragmente

Analytische Größenausschlusschromatographie zur Bestimmung der Dimer- und Multimerbildung der CD30-spezifischen scFv-Fragmente SH313-B5, -F9 und -H4. Als Laufpuffer wurde PBS benutzt. Es wurde die Säule Superdex75 Highload 16-60 (Trennleistung 3-70 kDa) mit einer Flussrate von 0,75 mL/min eingesetzt. Jeweils 40 µg der scFv-Fragmente wurden aufgetrennt. In den Chromatogrammen ist die Absorption bei 280 nm in Bezug zu der Retentionszeit des scFv-Fragmentes dargestellt.

Für den Antikörper SH313-B5 konnte die geringste Tendenz zur Bildung von Di- und Multimeren nachgewiesen werden, da 83 % Monomere und 16 % größere Komplexe ermittelt wurden. Für die scFv-Fragmente SH313-F9 und SH313-H4 wurden jeweils ~60 % Monomere und ~40 % Di- und Multimeren nachgewiesen (Tabelle 4-5).

Tabelle 4-5: Prozentualer Anteil an Mono-, Di- und Multimeren der scFv-Fragmente

scFv-Fragment	Monomere	Di- und Multimeren
SH313-B5	83 %	16 %
SH313-F9	61 %	38 %
SH313-H4	64 %	36 %

4.3.5 Bestimmung der Affinität mittels Oberflächenplasmonenresonanz

Die Affinitäten der Antikörper für das rekombinante Antigen CD30-mFc wurden mittels Oberflächenplasmonenresonanz bestimmt (Abbildung 4-13). Das Antigen CD30-mFc wurde direkt auf einem CM5-Chip gekoppelt und die monovalenten scFv-Fragmente in verschiedenen Konzentrationen über das Antigen geleitet. Anhand der zeitabhängigen Massenzunahme und -abnahme konnten die Affinitäten (K_D -Werte) der Antikörper bestimmt werden. Für die Auswertung wurde das Modell Langmuir 1:1-Bindung mit Trennung von Assoziations- und Dissoziationsphase gewählt. Als Vergleich zu den scFv-Fragmenten SH313-B5, -F9, -G9 und -H4 wurde der CD30-spezifische Kontrollantikörper 4E3 untersucht.

In Abbildung 4-13 sind die Verläufe der Assoziation an und Dissoziation vom Antigen CD30-mFc für die scFv-Fragmente dargestellt und in Tabelle 4-6 sind die Ergebnisse der Messung zusammengefasst.

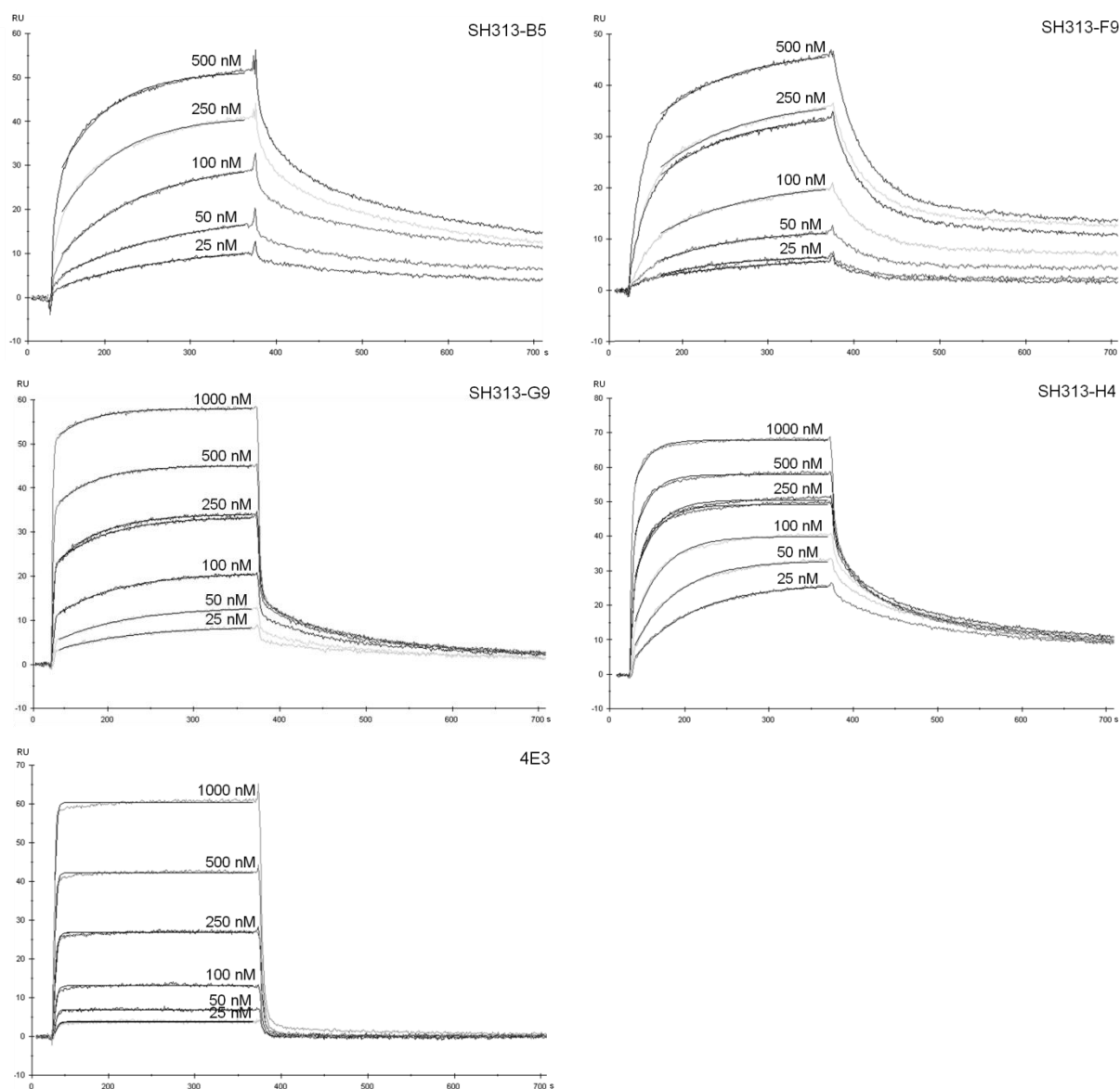


Abbildung 4-13: Bestimmung der Antikörperaffinität für das Antigen CD30-mFc

Bestimmung der Affinität der CD30-spezifischen scFv-Fragmente SH313-B5, -F9, -G9, -H4 und 4E3 für das Antigen CD30-mFc mittels Oberflächenplasmonenresonanz. Das Antigen bzw. BSA als Kontrolle wurde auf einen CM5-Chip gekoppelt und die Antikörper mit Konzentrationen von 0 nM bis 500 nM bzw. 1000 nM (teilweise Duplikate) mit einer Flussrate von 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ über den Liganden geleitet. Die Auswertung erfolgte nach Langmuir mit einer 1:1-Bindung und Trennung von Assoziation und Dissoziation.

Die Antikörper SH313-F9 und SH313-H4 wiesen mit $1,6 \cdot 10^{-8}$ M und $2,0 \cdot 10^{-8}$ M die höchsten Affinitäten für das Antigen CD30-mFc auf. Es konnten für beide scFv-Fragmente vergleichbar schnelle Assoziationen an das Antigen nachgewiesen werden, während die Dissoziation des scFv-Fragmentes SH313-F9 vom Antigen langsamer stattfand. Für den Antikörper SH313-B5 wurde mit $3,3 \cdot 10^{-8}$ M eine minimal niedrigere Affinität für CD30-mFc ermittelt. Im Vergleich zum Antikörper SH313-F9 hatte er eine langsamere Assoziation und schnellere Dissoziation. Die Affinität des scFv-Fragmentes SH313-G9 war mit $2,0 \cdot 10^{-7}$ M deutlich niedriger, was durch eine erhöhte Dissoziationsgeschwindigkeit vom Antigen bedingt war. Der Kontrollantikörper 4E3 wies nur eine sehr schwache Affinität von $6,1 \cdot 10^{-6}$ M für

CD30-mFc auf, die durch eine extrem schnelle Dissoziation des Antikörpers vom Antigen zustande kam.

Tabelle 4-6: Zusammenfassung der Ergebnisse der Oberflächenplasmonenresonanz

scFv-Fragment	SH313-B5	SH313-F9	SH313-G9	SH313-H4	4E3
k_{on} [$M^{-1} s^{-1}$]	$6,0 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^5$	$7,4 \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^5$
k_{off} [s^{-1}]	$1,6 \cdot 10^{-3}$	$8,1 \cdot 10^{-4}$	$7,6 \cdot 10^{-3}$	$2,9 \cdot 10^{-3}$	$3,2 \cdot 10^{-1}$
K_D [M]	$3,3 \cdot 10^{-8}$	$1,6 \cdot 10^{-8}$	$2,0 \cdot 10^{-7}$	$2,0 \cdot 10^{-8}$	$6,1 \cdot 10^{-6}$
χ^2 [RU]	0,12	0,08	0,05	0,32	0,15

Die Qualität der Daten wird durch den χ^2 -Wert beurteilt, bei dem es sich um den quadratischen Mittelwert des Signalrauschens handelt. Er ermöglicht eine Aussage zu der Übereinstimmung der experimentellen Daten mit dem verwendeten Modell Langmuir 1:1-Bindung und sollte nicht höher als 2 RU sein [91]. Die ermittelten χ^2 -Werte lagen für die fünf untersuchten scFv-Fragmente SH313-B5, -F9, -G9, -H4 und 4E3 zwischen 0,05 RU und 0,32 RU und belegten somit eine sehr hohe Datenqualität.

4.3.6 Bindung an CD30⁺ Lymphomzellen

Die Bindung der CD30-spezifischen scFv-Fc Antikörper CD30⁺ Lymphomzellen wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dazu wurden CD30⁺ Karpas299 und als Kontrolle CD30⁻ HD-MY-Z Zellen eingesetzt und die Bindung von 1 μ g/mL bzw. 10 μ g/mL Antikörper analysiert. Als Isotypenkontrolle wurde der nicht-CD30-spezifische scFv-Fc Antikörper MS112-IIB1 eingesetzt. Zur besseren Veranschaulichung der Ergebnisse wurde das Verhältnis aus den mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der Proben und Kontrollen ermittelt.

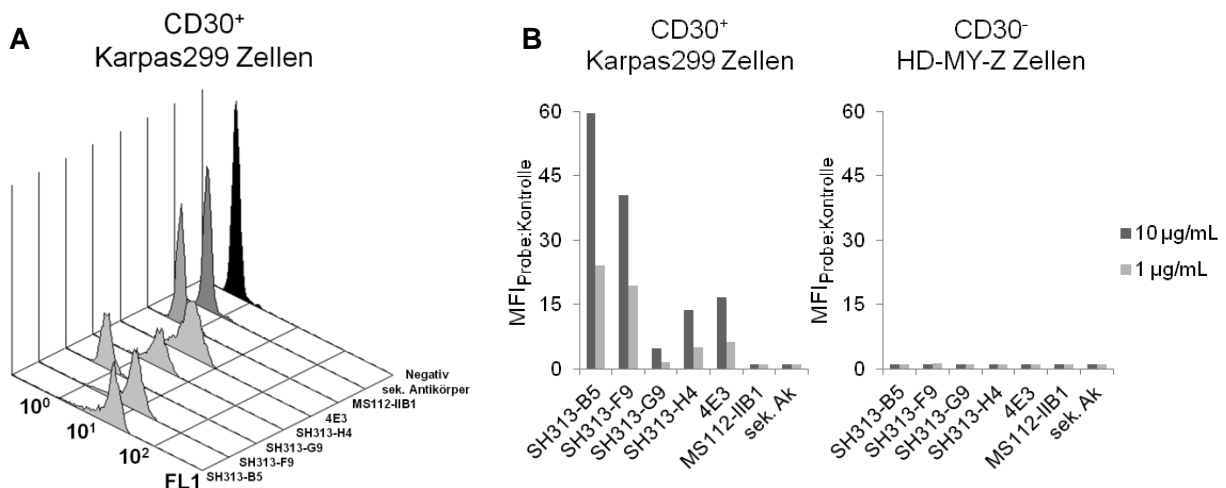


Abbildung 4-14: Bindung der scFv-Fc Antikörper an CD30⁺ Lymphomzellen

Durchflusszytometrische Bestimmung der Bindung der CD30-spezifischen scFv-Fc Antikörper (1 μ g/mL) an CD30⁺ Karpas299 Zellen (**A**, Histogramm) und Verhältnis der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der Proben zur Kontrolle für CD30⁺ Karpas299 und CD30⁻ HD-MY-Z Zellen (**B**, Säulendiagramme). Es wurden $1 \cdot 10^5$ Zellen mit 100 μ L (1 μ g/mL bzw. 10 μ g/mL) scFv-Fc Antikörpern inkubiert. Der Nachweis erfolgte durch einen Ziege anti-Human IgG (Fc-spezifischen) FITC-konjugierten Antikörper und Ermittlung der grünen Fluoreszenz (FL1) mittels Durchflusszytometrie. Als Isotypen-Kontrolle wurde der scFv-Fc Antikörper MS112-IIB1 verwendet. (sek. Ak: Färbung nur mit Sekundärantikörper)

Die fünf untersuchten CD30-spezifischen scFv-Fc Antikörper SH313-B5, -F9, -G9, -H4 und 4E3 banden an CD30⁺ Lymphomzellen, während für den als Isotypenkontrolle eingesetzten Antikörper MS112-IIB1 keine Bindung nachgewiesen wurde (Abbildung 4-14 A).

Die Auswertung der MFI (Abbildung 4-14 B) verdeutlicht, dass der Antikörper SH313-B5 eine viermal stärkere Bindung an die CD30⁺ Zellen als die Antikörper SH313-G9 und 4E3 aufwies. Für den Antikörper SH313-F9 wurde die zweitstärkste Bindung ermittelt. Das Signal bei 10 µg/mL eingesetztem Antikörper war für alle fünf CD30-spezifischen scFv-Fc Antikörper doppelt so hoch wie bei einer Konzentration von 1 µg/mL. Es wurde keine unspezifische Bindung an CD30⁻ HD-MY-Z Zellen und keine Bindung der Isotypenkontrolle MS112-IIB1 an CD30⁺ Karpas299 Zellen nachgewiesen.

4.3.7 Übersicht über die Eigenschaften der Antikörper

Alle untersuchten Eigenschaften der fünf CD30-spezifischen Antikörper sind in Tabelle 4-7 zusammengefasst. Der Antikörper SH313-B5 wies die stärkste Bindung an das rekombinante CD30 und CD30⁺ Lymphomzellen mit einer sehr hohen Affinität auf. Dieser Antikörper wurde deswegen im Weiteren als *Targeting*-Domäne in den folgenden Untersuchungen mit den ImmunRNasen verwendet.

Tabelle 4-7: Zusammenfassung der Eigenschaften der Antikörper

Eigenschaft	SH313-B5	SH313-F9	SH313-G9	SH313-H4	4E3
¹ Bindung an rekombinantes CD30-mFc	+++	++	+	++	nicht bestimmt
² Epitop auf CD30	linear	konformationell	konformationell	konformationell	nicht bestimmt
Anteil an Dimeren und Multimeren	16 %	38 %	nicht bestimmt	36 %	nicht bestimmt
³ Affinität für CD30-mFc	+++	+++	++	+++	+
⁴ Bindung an CD30 ⁺ Zellen (1 µg, 1*10 ⁵ Zellen)	++++	+++	+	++	++
Eignung als Targeting-Domäne für ImmunRNasen	ja	ja	nein	ja	nein

¹ + Absorption [450-620 nm] bis 0,2; ++ Absorption [450-620 nm] 0,2-0,6; +++ Absorption [450-620 nm] >0,6

² linear: Ak bindet bei 95 °C behandeltes Antigen; konformationell: Ak bindet nur bei 56 °C behandeltes Antigen

³ + 10⁻⁶ M; ++ 10⁻⁷ M; +++ 10⁻⁸ M

⁴ + MFI 1-10; ++ MFI 10-30; +++ MFI 30-50; ++++ MFI >50

4.4 ImmunRNasen

In ImmunRNasen sollen die Spezifität eines Antikörpers und der zytotoxische Effekt einer RNase kombiniert werden. Die Antikörperdomäne ermöglicht die selektive Bindung an Zielzellen, die nach der Internalisierung der ImmunRNase durch die RNase zerstört werden sollen [4].

In den vorangegangenen Studien wurden die CD30-spezifischen Antikörper SH313-B5, -F9, -G9 und -H4 charakterisiert und der Antikörper SH313-B5 als *Targeting*-Domäne für die ImmunRNasen ausgewählt. Im Gegensatz dazu konnte bei den Untersuchungen zu den humanen RNasen 1-8 noch keine eindeutige Wahl getroffen werden, so dass alle acht RNasen als Effektordomäne in den ImmunRNasen untersucht werden sollten. Parallel wurde der nicht-CD30-spezifische Antikörper MS112-IIB1 als Isotypenkontrolle eingesetzt.

4.4.1 Konstruktion von Antikörper-RNase Fusionsproteinen mit verschiedenen Linkern

Die ImmunRNasen wurden als scFv-hFc-RNase Fusionsproteine mit drei verschiedenen Linkern zwischen dem Antikörperteil und der RNase konstruiert (Abbildung 4-15).

Zum Einen wurde ein sieben Aminosäure langer Glycin-Serin-Linker (Gly-Ser) verwendet, der eine hohe Beweglichkeit der RNase am Antikörper gewährleisten soll.

Zum Anderen wurden zwei intrazellulär spaltbare Adapter (Ad_{emc} bzw. Ad_{mc}) verwendet. Der dreiteilige Ad_{emc} besteht aus einer endosomalen Schnittstelle (e) für die Abspaltung des hFc-Teils in den Endosomen und einer Translokationsdomäne (m) für die Freisetzung aus den Endosomen in das Zytoplasma der Zelle. Die zytosolische Schnittstelle (c) soll eine Abtrennung des verbliebenen Adapters von der RNase ermöglichen. Der verkürzten Variante Ad_{mc} fehlt die endosomale Schnittstelle (e), so dass durch die Translokationsdomäne (m) die Freisetzung der ImmunRNase aus den Endosomen in das Zytoplasma und dort die Abtrennung der RNase von dem Antikörperteil stattfinden soll [92, 93].

Die Antikörper SH313-B5 bzw. MS112-IIB1, die Linker und die humanen RNasen 1-8 wurden in den Säugerzell-Expressionsvektor pCMV5.2-hIgG1-Fc-XP kloniert.



Abbildung 4-15: Schematische Übersicht über die Linker zwischen RNase und Antikörper

Die potentiellen Spaltstellen in den Adaptern Ad_{emc} und Ad_{mc} sind mit ▼ gekennzeichnet.

4.4.2 Produktion und Reinigung von scFv-Fc-RNase Fusionsproteinen

Nach der Produktion der Fusionsproteine in HEK293 6E Zellen und der Reinigung mittels Protein A Affinitätschromatographie wurde mittels SDS-PAGE eine Instabilität des dreiteiligen Adapters Ad_{emc} festgestellt (nicht gezeigt), so dass dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde. Die ImmunRNasen SH313-B5-hFc-RN1-8 mit dem Glycin-Serin-Linker bzw. SH313-B5-hFc- Ad_{mc} -RN1-8 mit dem zweiteiligen Adapter wurden je nach RNase mit Ausbeuten von ~12 mg/L bis ~90 mg/L produziert. Die Fusionsproteine mit RNase1 ließen sich mit besonders hohen Ausbeuten produzieren, während diejenigen mit RNase3 und RNase7 sehr niedrige Ausbeuten aufwiesen. Nach der Reinigung wurden die ImmunRNasen unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen per SDS-PAGE analysiert. In Abbildung 4-16 ist beispielhaft das Ergebnis für den Antikörper SH313-B5-hFc und die ImmunRNasen mit dem Glycin-Serin-Linker (SH313-B5-hFc-RN1-8) dargestellt.

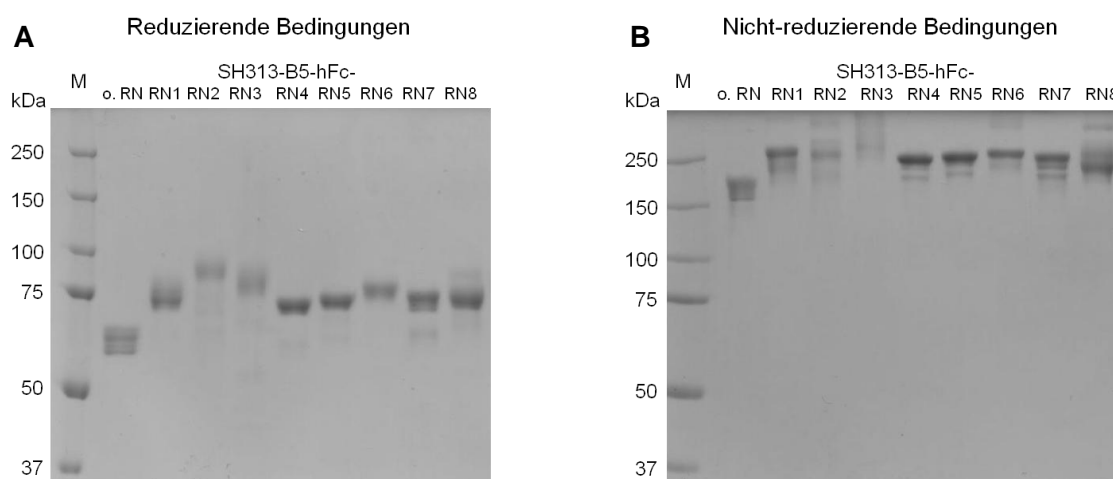


Abbildung 4-16: SDS-PAGEs des Antikörpers SH313-B5-hFc und der ImmunRNasen SH313-B5-hFc-RN1-8
Coomassiegefärbte, 8 %ige SDS-Gele des produzierten und gereinigten Antikörpers und der ImmunRNasen mit dem Glycin-Serin-Linker (SH313-B5-hFc-RN1-8) unter reduzierenden Bedingungen (10 min, 95 °C) (A) und nicht-reduzierenden Bedingungen (10 min, 56 °C) (B). Jeweils 1 µg Protein wurde aufgetragen. (o. RN: ohne RNase; M: Marker)

Die Analyse der Proteine mittels SDS-PAGE ließ Aussagen über die Dimerisierung durch den Fc-Teil des Antikörpers und eventuell auftretender Proteinaggregate sowie den Grad der Glykosylierungen zu. Der Antikörper SH313-B5-hFc wies unter reduzierenden Bedingungen ein apparentes molekulares Gewicht von ~60 kDa auf, welches dem Molekulargewicht eines Monomers entspricht. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen wies das Protein eine Größe von ~180 kDa auf, die deutlich über der erwarteten Größe des Homodimers (~110 kDa) lag. Für die Fusionsproteine aus dem Antikörper SH313-B5-hFc und den RNasen 1-8 waren unterschiedliche Eigenschaften zu beobachten. Während die ImmunRNasen mit den RNasen 4, 5, 6, 7 und 8 unter reduzierenden Bedingungen scharfe Einzelbanden in den erwarteten Größen von ~70 kDa aufwiesen, wurden für die Fusionsproteine mit den RNasen 1, 2 und 3 verschmierte Banden oberhalb der erwarteten Größe nachgewiesen, was auf heterogene Glykosylierungen schließen ließ. Auffällig war, dass für das Fusionsprotein mit

RNase3 unter nicht-reduzierenden Bedingungen keine definierte Bande nachgewiesen werden konnte, welches ein erster Hinweis auf die Bildung von Multimeren bzw. Aggregaten sein kann.

Die hier dargestellten Ergebnisse der SDS-PAGEs waren mit den Ergebnissen der ImmunRNasen mit dem spaltbaren Adapter SH313-B5-hFc-Ad_{mc}-RNase1-8 vergleichbar (nicht gezeigt).

4.4.3 Bestimmung von Proteinkomplexen mittels Größenausschlusschromatographie

Die Ergebnisse für die apparenten molekularen Massen und die Bildung von Multimeren bzw. Aggregaten der Fusionsproteine sollten im Weiteren mittels analytischer Größenausschlusschromatographie bestätigt werden. In Abbildung 4-17 sind die Ergebnisse für den Antikörper SH313-B5-hFc und die ImmunRNasen mit dem Glycin-Serin-Linker SH313-B5-hFc-RN1-8 dargestellt.

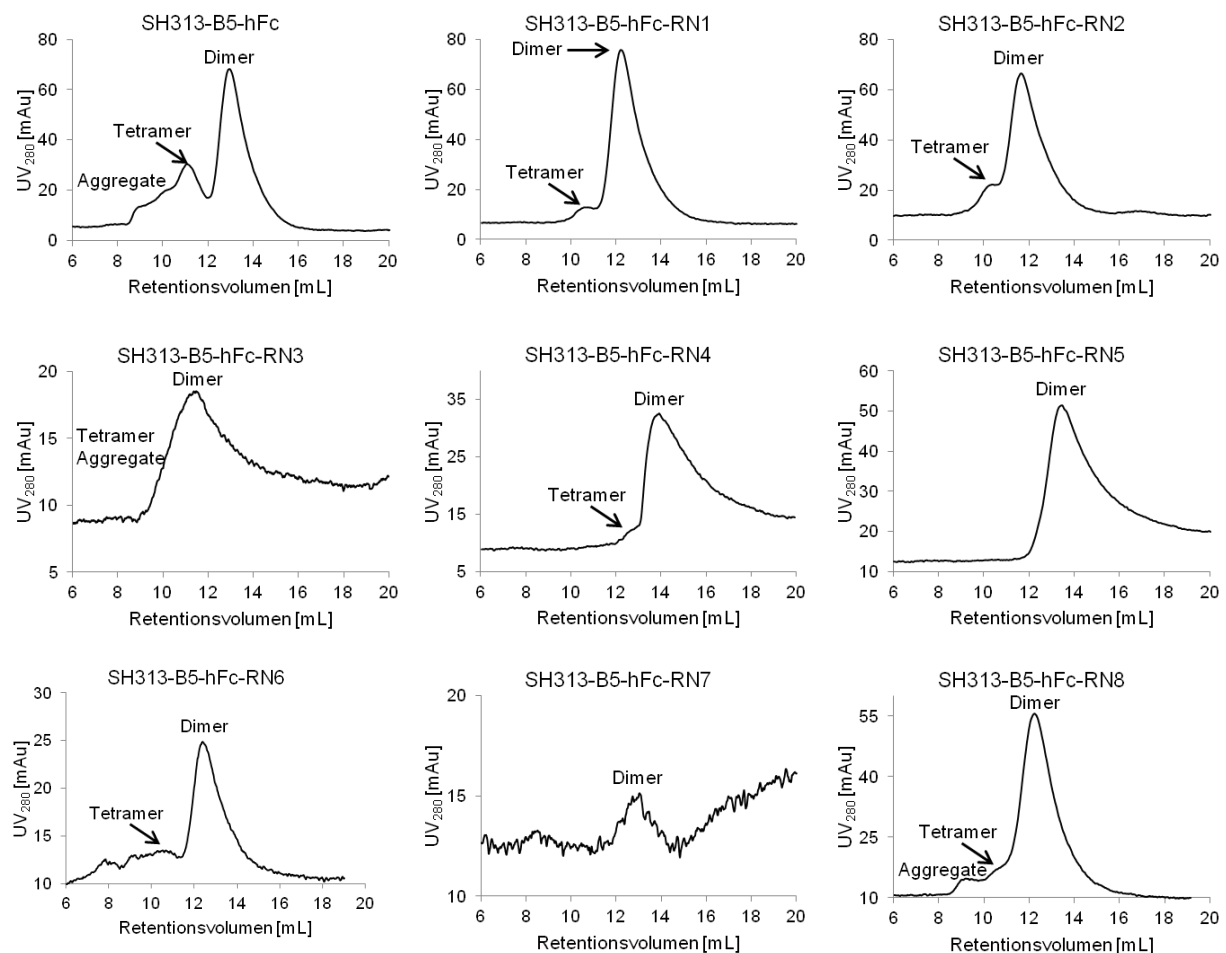


Abbildung 4-17: Bestimmung der Komplexbildung des Antikörpers SH313-B5-hFc und der ImmunRNasen SH313-B5-hFc-RN1-8 mittels Größenausschlusschromatographie

Analytische Größenausschlusschromatographie zur Bestimmung der Komplexbildung der Proteine SH313-B5-hFc und SH313-B5-hFc-RN1-8. Als Laufpuffer wurde PBS benutzt. Es wurde die Säule Superdex200 10/300 GL (Trennleistung 10-600 kDa) mit einer Flussrate von 0,3 mL/min eingesetzt und jeweils 100 µg der Proteine aufgetrennt. In den Chromatogrammen ist die Absorption bei 280 nm in Bezug zu der Retentionszeit des jeweiligen Proteins dargestellt. Die Skalierung der Ordinate wurde je nach Absorptionswert des Proteins variiert.

Für acht der neun untersuchten Proteine wurde primär die Ausbildung von Homodimeren und nur sekundär die Bildung von Tetrameren und Aggregaten nachgewiesen. Eine Ausnahme stellte das Fusionsprotein mit RNase3 dar, welches ein starkes Aggregationsverhalten aufwies. Ein Vergleich der Absorptionswerte aller untersuchten Proteine wies auf eine Instabilität des Fusionsproteins mit RNase7 hin. Obwohl alle Proteine in gleichen Konzentrationen eingesetzt wurden, konnte für die ImmunRNase mit RNase7 nur ein kleiner Absorptionswert von ~ 3 mAu detektiert werden.

Die hier dargestellten Ergebnisse stimmen mit denen der Größenausschlusschromatographie der Fusionsproteine mit dem spaltbaren Adapter überein (Daten im Anhang A.1).

4.4.4 Bestimmung der RNaseaktivität

Die Enzymeffizienzen k_{cat}/K_M der ImmunRNasen SH313-B5-hFc-RN1-8 wurden gemäß der Durchführung für die RNasen (siehe 4.1.4) ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-8 zusammengefasst.

Tabelle 4-8: Ermittelte k_{cat}/K_M -Werte der Fusionsproteine SH313-B5-hFc-RNase1-8

SH313-B5-hFc-RNase	k_{cat}/K_M [$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$] Substrat U	k_{cat}/K_M [$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$] Substrat C	Präferenz
1	$2,9 \cdot 10^6$	$3,2 \cdot 10^6$	
2	$1,1 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^6$	
3	$4,9 \cdot 10^4$	$5,2 \cdot 10^4$	
4	$6,9 \cdot 10^5$	$5,1 \cdot 10^5$	(U)
5	$2,2 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^4$	(U)
6	$4,4 \cdot 10^4$	$4,3 \cdot 10^4$	
7	$4,0 \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^5$	C
8	$2,3 \cdot 10^4$	$2,0 \cdot 10^4$	

Aktivitäten mit Präferenz für eines der beiden Substrate sind fett hervorgehoben.

Die größte ribonukleolytische Aktivität wurde für das Fusionsprotein mit RNase1 nachgewiesen. Die Enzymeffizienz war für beide Substrate $\sim 3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$. Auch die ImmunRNase mit RNase2 wies mit $\sim 1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ eine sehr hohe Aktivität auf. Die schwächsten Aktivitäten hatten die Fusionsproteine mit RNase5 und RNase8, die jeweils für beide Substrate Werte von $\sim 2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ aufwiesen. Für die Fusionsproteine mit RNase4 bzw. RNase5 und RNase7 konnten Präferenzen für eines der beiden Substrate nachgewiesen werden, die aber nur im Fall der ImmunRNase mit RNase7 deutlich ausgeprägt war.

4.4.5 Inhibition der RNaseaktivität

Die Inhibition der RNaseaktivität der ImmunRNasen SH313-B5-hFc-RN1-8 wurde gemäß der Durchführung für die RNasen (siehe 4.1.5) untersucht und ausgewertet (Abbildung 4-18).

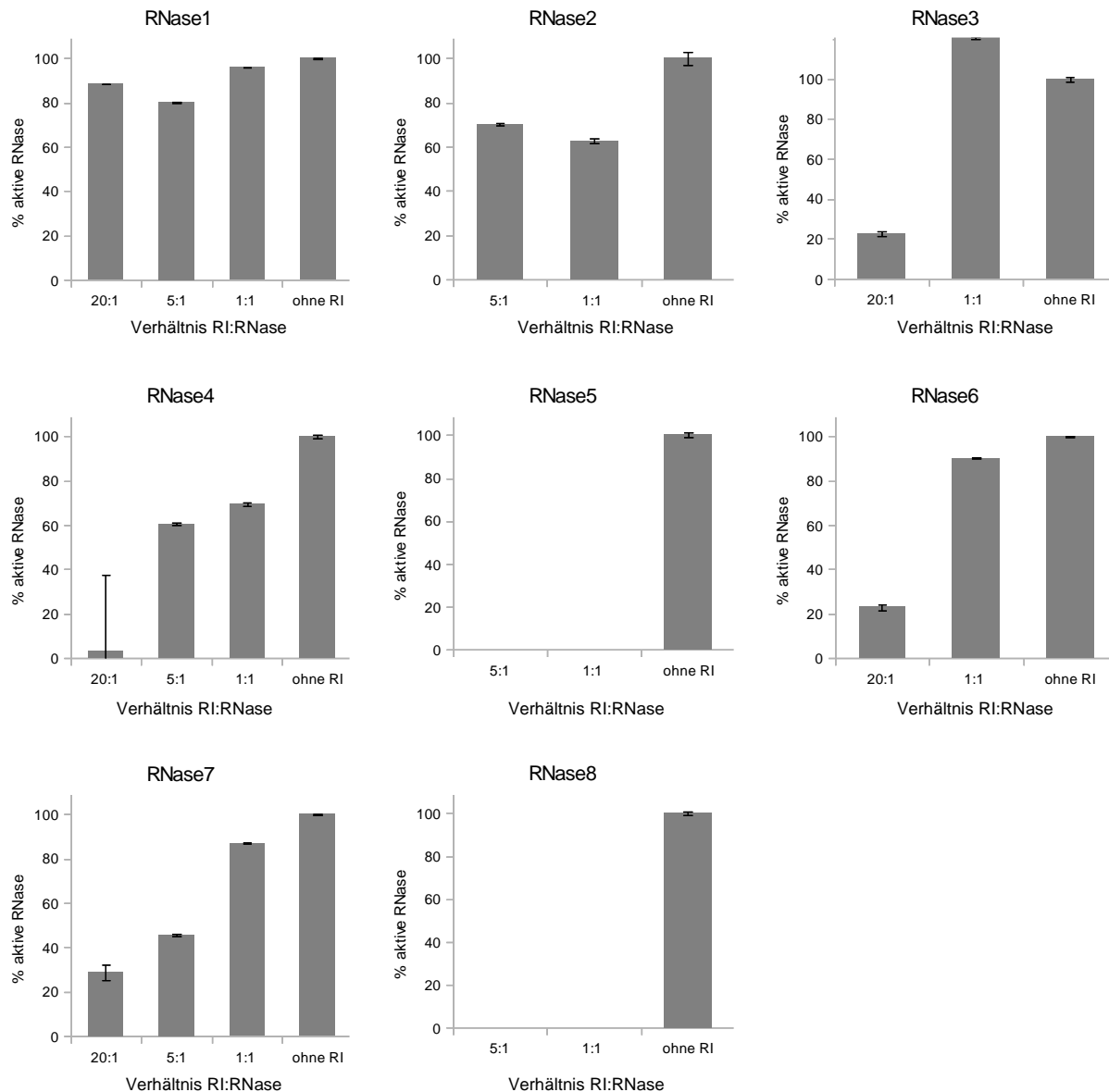


Abbildung 4-18: Inhibition der RNaseaktivität der ImmunRNasen durch den RI

Bestimmung des Inhibitionsgrades der RNaseaktivität durch den humanen RI für die ImmunRNasen SH313-B5-hFc-RN1-8. Die jeweilige ImmunRNase wurde ohne RI und mit Zugabe von bis zu 20-fachem molarem Überschuss an RI eingesetzt. Es wurden die optimalen RNasekonzentrationen und 5 nM Substrat in einem Gesamtansatz von 200 µL in MES-Puffer eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde ein paralleler Ansatz ohne Zugabe von RNase vermessen. Es wurden jeweils Triplikate untersucht. Die Messung erfolgte in 30 Zyklen à 30 s und weiteren 60 Zyklen à 120 s. Für die Auswertung wurde der jeweilige Ansatz ohne RI als 100 % Aktivität festgesetzt.

Für die Fusionsproteine mit RNase5 und RNase8 wurde eine vollständige Hemmung bereits durch eine äquimolare Menge (1:1) an RI erreicht. Die ImmunRNasen mit den RNasen 3, 4, 6 und 7 wurden deutlich gehemmt, ein 20-facher molarer Überschuss an RI war für die vollständige Hemmung der RNaseaktivität jedoch nicht ausreichend. Bei der Zugabe von RI zu den Fusionsproteinen mit den RNasen 1 und 2 konnte eine Verringerung der RNaseaktivität nachgewiesen, eine eindeutige Hemmung hingegen nicht detektiert werden.

4.4.6 Bindung der ImmunRNasen an CD30⁺ Lymphomzellen

Um einen Einfluss der RNasen auf die Bindung der CD30-spezifischen ImmunRNasen SH313-B5-hFc-Ad_{mc}-RN1-8 an Zellen zu untersuchen, wurde eine durchflusszytometrische Messung mit CD30⁺ Karpas299 Zellen (Abbildung 4-19 A) durchgeführt. Als Kontrollen wurden die Bindung der ImmunRNasen mit dem Kontrollantikörper MS112-IIB1 (Abbildung 4-19 B) sowie die Bindung an CD30⁻ Jurkat Zellen (Abbildung 4-19 C) analysiert.

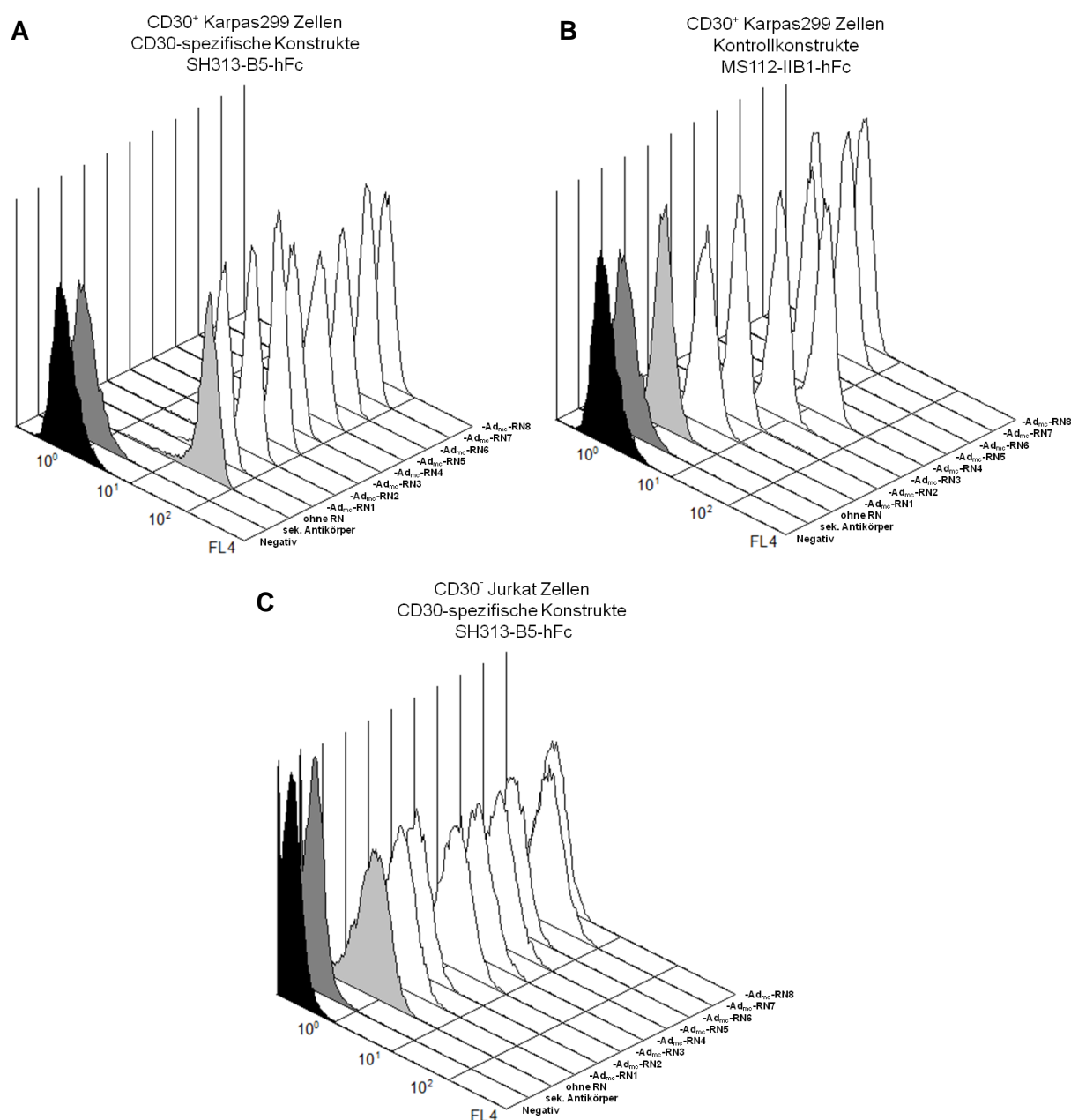


Abbildung 4-19: Bindung der ImmunRNasen an CD30⁺ Lymphomzellen

Durchflusszytometrische Bestimmung der Bindung des CD30-spezifischen Antikörpers SH313-B5-hFc und der ImmunRNasen SH313-B5-hFc-Ad_{mc}-RN1-8 an CD30⁺ Karpas299 Zellen (**A**) und CD30⁻ Jurkat Zellen (**C**). Als Isotypenkontrolle wurden der Kontrollantikörper MS112-IIB1 und die entsprechenden Fusionsproteine auf CD30⁺ Karpas299 Zellen untersucht (**B**). Es wurden 1*10⁵ Zellen mit 100 µL (10 µg/mL) der Proteine inkubiert. Der Nachweis erfolgte durch einen Ziege anti-human IgG (Fc-spezifischen) FITC-konjugierten Antikörper und Ermittlung der grünen Fluoreszenz (FL1) mittels Durchflusszytometrie. (sek. Ak: Sekundärantikörper)

Für eine bessere Veranschaulichung der Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung wurde das Verhältnis aus den mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der Proben und der Negativkontrolle ermittelt und die Ergebnisse in Abbildung 4-20 dargestellt.

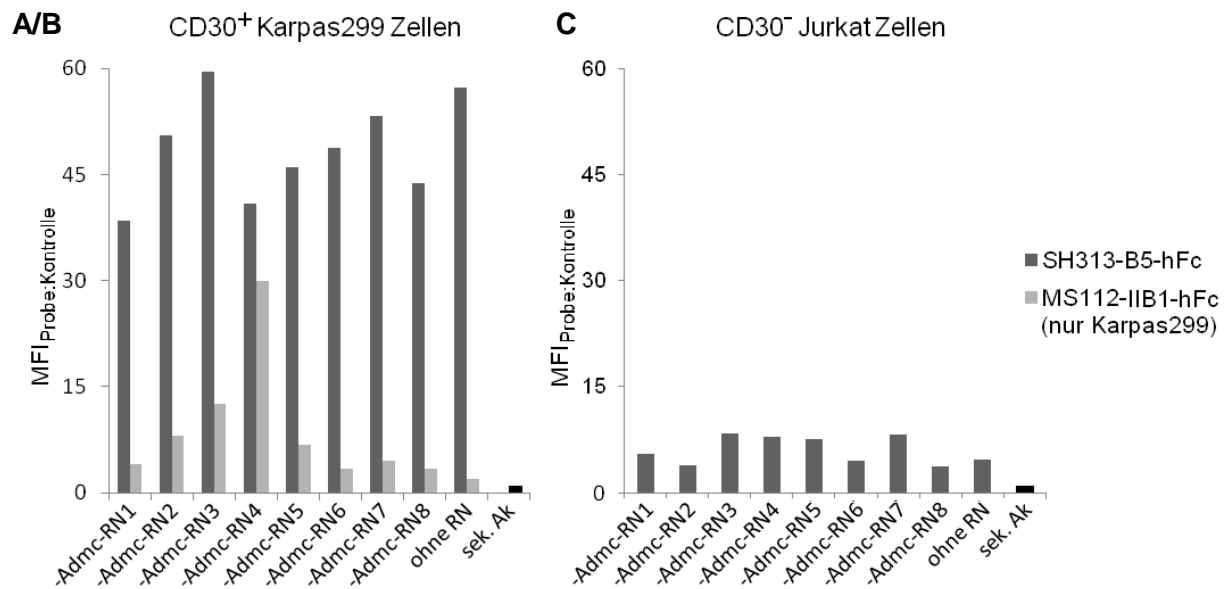


Abbildung 4-20: Bindung der ImmunRNasen an CD30⁺ Lymphomzellen - Mittlere Fluoreszenzintensitäten

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse (vergleiche Abbildung 4-19) wurden für eine bessere Veranschaulichung anders ausgewertet. Es wurde das Verhältnis aus den mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der Proben und der Negativkontrolle ermittelt und graphisch aufgetragen. (sek. Ak: Sekundärantikörper)

Die Stärke der Bindung an die CD30⁺ Karpas299 Zellen war für alle ImmunRNasen mit dem CD30-spezifischen Antikörper SH313-B5 nahezu identisch und entsprach dem Antikörper ohne RNase (Abbildung 4-19 A und Abbildung 4-20 A). Auch die ImmunRNasen mit dem Kontrollantikörper MS112-IIB1 und den RNasen 3 und 4 wiesen eine Bindung an die CD30⁺ Karpas299 Zellen auf. Für den Kontrollantikörper ohne RNase wurde hingegen keinerlei Bindung nachgewiesen (Abbildung 4-19 B und Abbildung 4-20 B). An die CD30⁻ Jurkat Zellen wurde eine schwache Bindung des Antikörpers SH313-B5-hFc und der entsprechenden ImmunRNasen ermittelt, wobei auch bei diesen Zellen die Bindung durch einige RNasen verstärkt wurde (Abbildung 4-19 C und Abbildung 4-20 C).

4.4.7 Einfluss der ImmunRNasen mit dem spaltbaren Adapter auf die Viabilität von CD30⁺ Lymphomzellen

ImmunRNasen sollen eine spezifische Zytotoxizität bzw. proliferationsinhibierende Wirkung gegen Zielzellen vermitteln, während umliegende Antigen-negative Zellen und Gewebe nicht beeinträchtigt werden sollen. Der Einfluss von Substanzen auf die Viabilität und das Wachstum von Zellen kann mit Hilfe des MTT-Tests untersucht werden. Die Umsetzung des Substrates MTT erfolgt von stoffwechselaktiven Zellen, so dass mit diesem Test nur lebende Zellen nachgewiesen werden und die Zahl dieser erfasst wird.

Die Wirkung der ImmunRNasen mit dem spaltbaren Adapter SH313-B5-hFc-Ad_{mc}-RNase1-8 und der entsprechenden Kontrollproteine mit dem Antikörper MS112-IIB1 auf CD30⁺ Karpas299 und CD30⁻ Jurkat Zellen wurde untersucht (Abbildung 4-21).

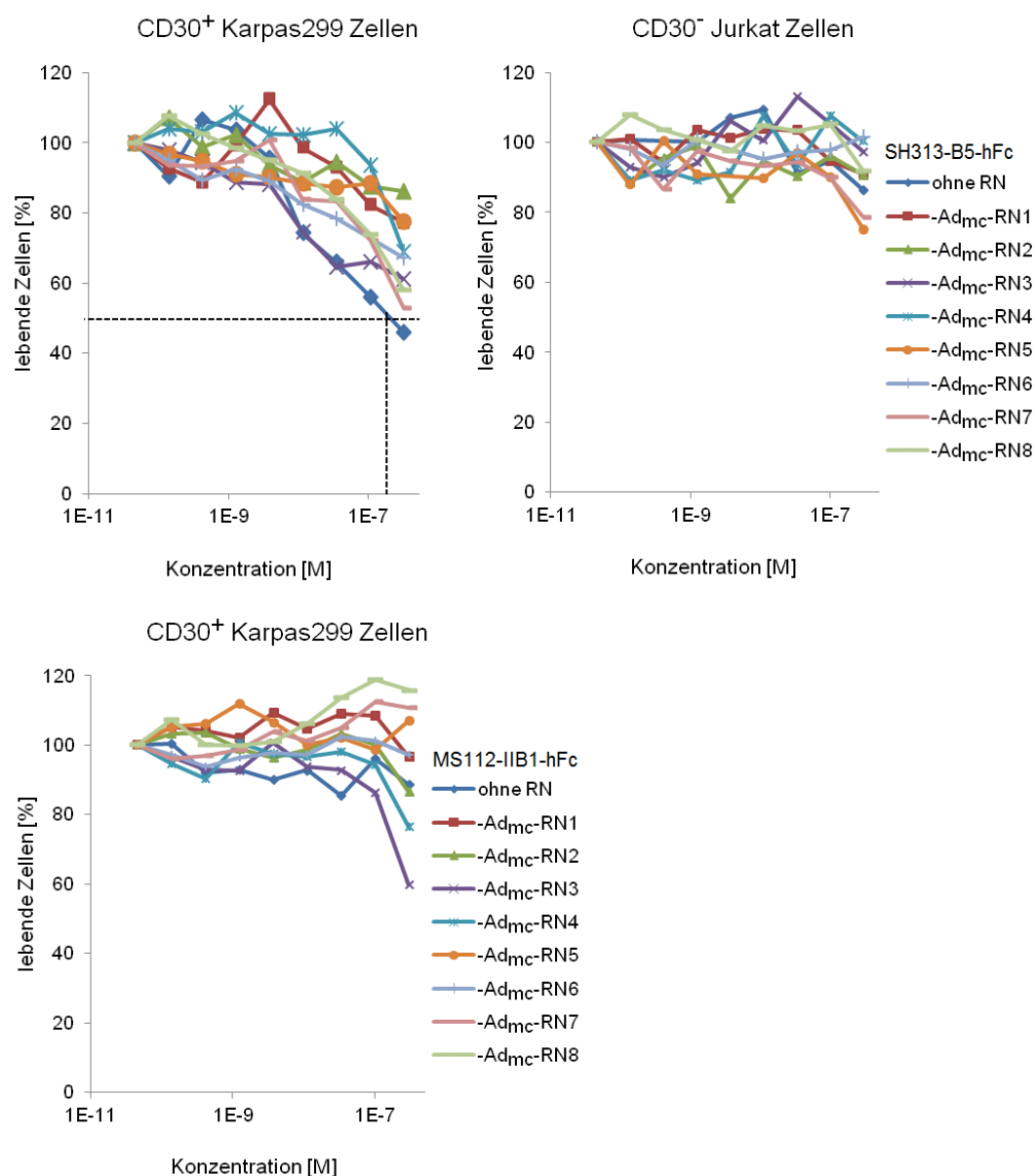


Abbildung 4-21: MTT-Test nach Inkubation von Lymphomzellen mit den ImmunRNasen SH313-B5-hFc-Ad_{mc}-RN1-8 und Kontrollen

Ermittlung des Einflusses der ImmunRNasen SH313-B5-hFc-Ad_{mc}-RN1-8 und der Kontroll-ImmunRNasen MS112-IIB1-hFc-Ad_{mc}-RN1-8 sowie der entsprechenden Antikörper ohne RNase auf die Viabilität bzw. das Wachstum von CD30⁺ Karpas299 und CD30⁻ Jurkat Zellen. Es wurden $5 \cdot 10^3$ Zellen/well eingesät und die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach 18 h wurden die Proteine in Konzentrationen von $3 \cdot 10^{-7}$ bis $5 \cdot 10^{-11}$ M in insgesamt 100 µL Kultivierungsmedium zugefügt (jeweils Triplikate). Nach 72 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde die MTT-Lösung (5 mg/mL) zugegeben und für weitere 4 h inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend mit saurem Isopropanol gestoppt und das Ergebnis bei einer Wellenlänge von 570 nm vermessen. Fehlerbalken sind für eine bessere Veranschaulichung nicht dargestellt.

Den stärksten Effekt auf die Viabilität bzw. das Wachstum der CD30⁺ Karpas299 Zellen wies der unfusionierte Antikörper SH313-B5-hFc auf. Dieser bewirkte bei einer Proteinkonzentration von $\sim 2 \cdot 10^{-7}$ M eine 50%ige Verringerung der Lebendzellzahl. Im Vergleich dazu

hatten die ImmunRNasen einen geringeren Einfluss auf die CD30⁺ Zellen. Für die ImmunRNasen SH313-B5-hFc-Ad_{mc}-RN3, -RN7 und -RN8 wurde bei der Konzentration von $\sim 2 \cdot 10^{-7}$ M eine Reduzierung der Zellzahl auf ~ 60 % ermittelt. Auch SH313-B5-hFc-Ad_{mc}-RN6 wies einen signifikanten Effekt auf, während die übrigen ImmunRNasen einen geringen Einfluss auf die Viabilität der CD30⁺ Zellen hatten.

Die Wirkung der ImmunRNasen SH313-B5-hFc-Ad_{mc}-RN1-8 und des Antikörpers SH313-B5 auf das Wachstum der CD30⁻ Jurkat Zellen war nicht signifikant.

Die ImmunRNasen mit dem Kontrollantikörper MS112-IIB1 hatten keinen Einfluss auf die Zellviabilität bzw. das Wachstum der CD30⁺ Zellen. Die Ausnahme war das Fusionsprotein mit RNase3, das aber nur bei der höchsten eingesetzten Proteinkonzentration von $3 \cdot 10^{-7}$ M einen signifikanten Effekt aufwies.

Durch den MTT-Test werden nur stoffwechselaktive, lebende Zellen erfasst, so dass keine Aussage darüber getroffen werden konnte, ob durch den Antikörper und die ImmunRNasen Apoptose oder eine Proliferationsinhibition ausgelöst wurde. Um Aufschluss darüber zu bekommen, wurde eine Vitalfärbung der Zellen durchgeführt. Die CD30⁺ Karpas299 und CD30⁻ Jurkat Zellen wurden 72 h lang mit dem Antikörper SH313-B5-hFc und einigen ImmunRNasen sowie den entsprechenden Kontrollproteinen mit dem Antikörper MS112-IIB1 inkubiert. Anschließend wurden durch eine Trypanblaufärbung die Lebend- und Totzellzahlen bestimmt. Es wurden die ImmunRNasen SH313-B5-hFc-Ad_{mc}-RN3, -RN6 und -RN8 ausgewählt, da sie den stärksten Effekt im MTT-Test aufwiesen. Die ImmunRNase SH313-B5-hFc-Ad_{mc}-RN7 wurde wegen ihrer Instabilität nicht weiter untersucht. Die für diesen Versuch eingesetzte Konzentration von $5 \cdot 10^{-7}$ M war höher als die höchste im MTT-Test untersuchte Konzentration von $3 \cdot 10^{-7}$ M (Abbildung 4-22).

Die Ergebnisse korrelierten mit denen des MTT-Tests. Sowohl der Antikörper SH313-B5-hFc als auch die entsprechenden ImmunRNasen mit den RNasen 3, 6 und 8 wiesen mit 10-30 % lebenden Zellen im Vergleich zu der Negativkontrolle ohne Protein einen signifikanten Einfluss auf die Viabilität bzw. das Wachstum der CD30⁺ Zellen auf. Auch die entsprechenden Fusionsproteine mit dem Kontrollantikörper MS112-IIB1 wiesen mit 50-80 % lebenden Zellen einen Effekt auf. Für das Kontrollprotein MS112-IIB1-hFc-Ad_{mc}-RN3 wurden nur noch 25 % lebende Zellen detektiert.

Auf die CD30⁻ Jurkat Zellen wurde ein geringer Effekt für die ImmunRNasen mit dem Antikörper SH313-B5-hFc und das Kontrollkonstrukt MS112-IIB1-hFc-Ad_{mc}-RN3 nachgewiesen, da 75-90 % lebende Zellen detektiert wurden. Die anderen untersuchten Proteine hatten keinen Einfluss auf die Viabilität bzw. das Wachstum der Zellen.

Für alle untersuchten Proteine lag die Zahl der detektierten toten Zellen im Mittel bei 1-2 %.

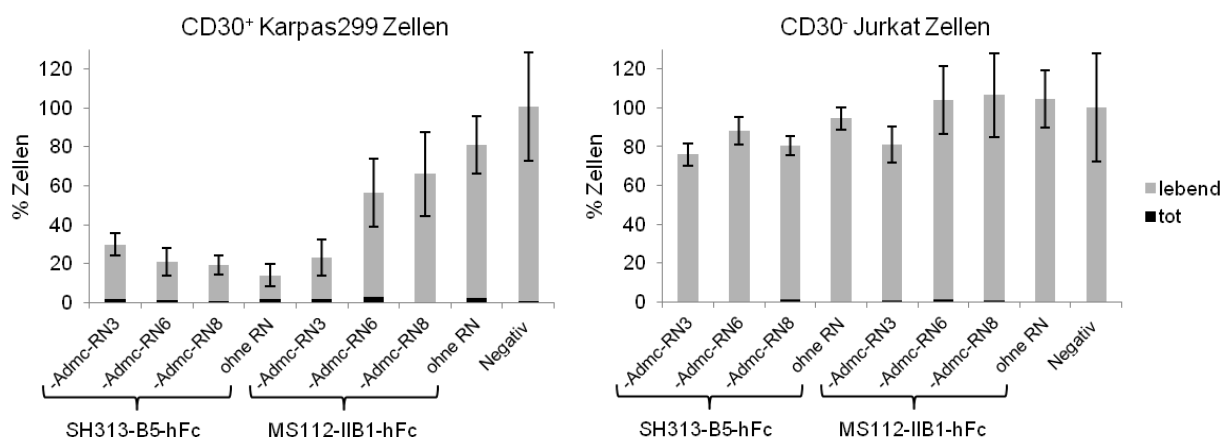


Abbildung 4-22: Analyse zum Mechanismus des Effektes des Antikörpers SH313-B5-hFc und der ImmunRNasen SH313-B5-hFc-Ad_{mc}-RN3, -RN6 und -RN8 auf Lymphomzellen

Vitalfärbung der CD30⁺ Karpas299 und CD30⁻ Jurkat Zellen nach 72 h Inkubation mit $5 \cdot 10^{-7}$ M des Antikörpers SH313-B5-hFc und der ImmunRNasen SH313-B5-hFc-Ad_{mc}-RN3, -6 und -8 sowie der entsprechenden Kontrollproteine mit dem Antikörper MS112-IIB1-hFc (jeweils Triplikate). Zur Unterscheidung zwischen Apoptose und Proliferationsinhibition wurden die Lebend- und Totzellzahlen durch eine Trypanblaufärbung bestimmt. Die unbehandelten Zellen (Negativ) wurden als 100 % Zellen festgesetzt.

4.4.8 Stabilitätsanalyse

Die Stabilität bei 37 °C wurde für die ImmunRNasen SH313-B5-hFc-RN3, -RN6, -RN8 bzw. SH313-B5-hFc-Ad_{mc}-RN3, -RN6, -RN8 und den Antikörper SH313-B5-hFc über einen Zeitraum von drei Tagen mittels SDS-PAGE untersucht (Abbildung 4-23), um die Abspaltung der RNase von dem Antikörper ausschließen zu können.

Für keine der untersuchten ImmunRNasen oder den Antikörper SH313-B5-hFc wurden Degradationen über den Zeitraum von 72 h nachgewiesen.

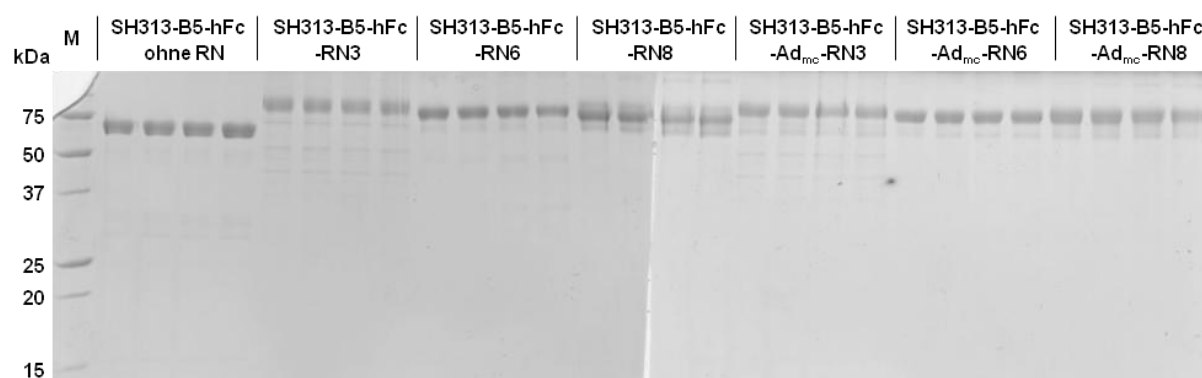


Abbildung 4-23: Untersuchung der Stabilität des Antikörpers SH313-B5-hFc und einiger ImmunRNasen

Coomassiegefärbtes, 15 %iges SDS-Gel des Antikörpers SH313-B5-hFc und der ImmunRNasen SH313-B5-hFc-RN3, -RN6, -RN8 bzw. SH313-B5-hFc-Ad_{mc}-RN3, -RN6, -RN8. Die Proteine wurden 72 h lang in PBS bei 37 °C inkubiert und nach 0 h, 24 h, 48 h und 72 h eine Probe entnommen. Jeweils 1 µg der Proteinproben wurden aufgetragen und so die Stabilität der Proteine untersucht. (M: Marker)

4.4.9 Internalisierung der ImmunRNasen in CD30⁺ Zellen

Die erfolgreiche Internalisierung der ImmunRNasen in die Zielzellen ist die Voraussetzung für das effektive Abtöten dieser Zellen. Nach der Bindung der ImmunRNasen an das Antigen auf der Zelloberfläche werden die Proteinkomplexe durch einen endozytotischen Prozess in die Zelle aufgenommen. Die ImmunRNasen sollen anschließend aus den Endosomen in das Zytoplasma gelangen und dort durch ihre ribonukleolytische Aktivität den Zelltod auslösen.

Für den Nachweis der Internalisierung der ImmunRNasen in CD30⁺ Karpas299 Zellen wurden die Proteine mit dem pH-sensitiven Farbstoff CyHer5E markiert. Dieser fluoresziert im roten Wellenlängenbereich, wenn das umgebende Milieu einen pH-Wert <7 aufweist, wie es in Endosomen der Fall ist. Die Internalisierung sollte mittels Durchflusszytometrie und konfokaler Laser Scanning Mikroskopie nachgewiesen werden.

Nachweis der Internalisierung mittels Durchflusszytometrie

Für die Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Internalisierung in die Zielzellen wurden die CD30⁺ Karpas299 und als Kontrolle die CD30⁻ Jurkat Zellen für 1 h mit den markierten ImmunRNasen SH313-B5-hFc-Ad_{mc}-RN3, -RN6 und -RN8 sowie dem Antikörper ohne RNase inkubiert und anschließend weitere 23 h in Medium kultiviert. Als Kontrolle wurden die jeweiligen Proteine mit dem Antikörper MS112-IIB1-hFc verwendet. Nach 1, 3, 5, 7 und 24 h wurden Proben entnommen und durchflusszytometrisch auf das Vorhandensein von roter Fluoreszenz untersucht. Zur besseren Veranschaulichung der Ergebnisse ist das Verhältnis aus den mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der Probe und der Negativkontrolle ermittelt und der zeitliche Verlauf dargestellt worden (Abbildung 4-24).

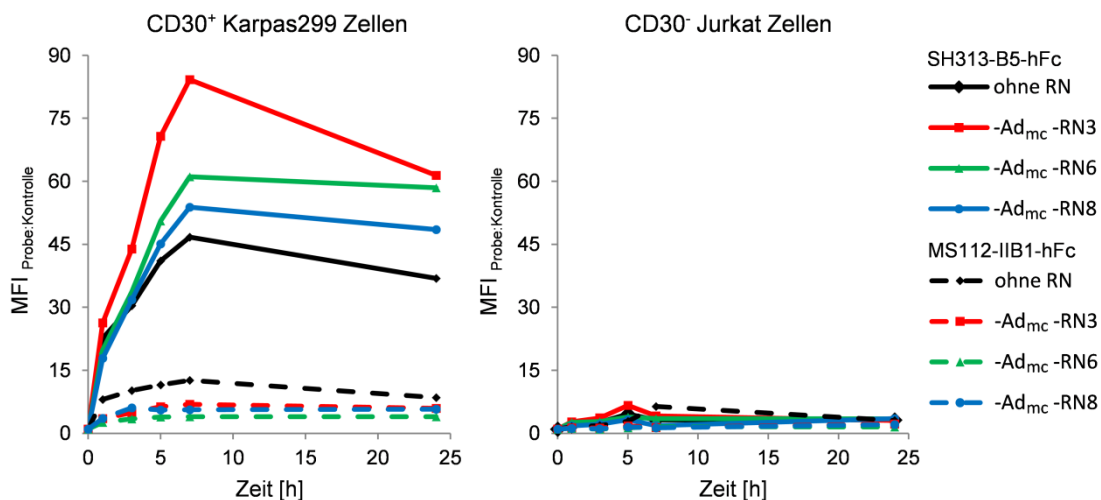


Abbildung 4-24: Nachweis der Internalisierung des Antikörpers SH313-B5-hFc und der ImmunRNasen SH313-B5-hFc-Ad_{mc}-RN3, -RN6 und -RN8 in Lymphomzellen mittels Durchflusszytometrie

Zeitlicher Verlauf der Internalisierung in CD30⁺ Karpas299 und CD30⁻ Jurkat Zellen. Der Antikörper SH313-B5-hFc und die Fusionsproteine SH313-B5-hFc-Ad_{mc}-RN3, -RN6 und -RN8 bzw. die entsprechenden Proteine mit dem Kontrollantikörper MS112-IIB1-hFc wurden mit dem Farbstoff CyHer5E markiert. Es wurden 1*10⁵ Zellen mit 2 µg der Proteine für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach einem Austausch des Mediums wurden die Zellen weitere 23 h kultiviert. Die Zellen wurden nach 1, 3, 5, 7 und 24 h mittels Durchflusszytometrie untersucht und die rote Fluoreszenz detektiert. Es wurde das Verhältnis aus den mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der Proben und der jeweiligen Negativkontrolle gebildet und der zeitliche Verlauf dargestellt.

Für die CD30-spezifischen ImmunRNasen und den Antikörper SH313-B5-hFc wurde eine starke Internalisierung in die CD30⁺ Karpas299 Zellen nachgewiesen. Die Fluoreszenz nahm schnell zu, erreichte bei 7 h ihr Maximum und wurde danach langsam wieder schwächer. Für die ImmunRNase mit RNase3 wurde die stärkste Internalisierung nachgewiesen.

Die Kontrollproteine mit dem Antikörper MS112-IIB1 wiesen eine sehr schwache Internalisierung in die CD30⁺ Karpas299 Zellen auf, wobei für den unfusionierten Antikörper die stärkste Internalisierung ermittelt wurde. Die MFI-Werte betrugen im Vergleich zu den CD30-spezifischen Konstrukten im Mittel lediglich ~15 % des höchsten gemessenen Wertes (SH313-B5-hFc-Ad_{mc}-RN3).

Für keines der untersuchten Proteine wurde eine Internalisierung in die CD30⁻ Jurkat Zellen festgestellt.

Nachweis der Internalisierung mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie

Zur direkten Visualisierung der Internalisierung wurde die konfokale Laser Scanning Mikroskopie eingesetzt. Die CD30⁺ Karpas299 und als Kontrolle die CD30⁻ Jurkat Zellen wurden 1 h lang mit den markierten ImmunRNasen SH313-B5-hFc-Ad_{mc}-RN3, -RN6 und -RN8 sowie dem Antikörper ohne RNase inkubiert und weitere 4 h lang in Medium kultiviert. Als Kontrolle wurden die jeweiligen Proteine mit dem Antikörper MS112-IIB1-hFc verwendet. Nach insgesamt 5 h wurden die Zellen mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie untersucht. Es wurde jeweils eine Aufnahme im Hellfeld, im DAPI-Kanal (343 nm, blau) und im CypHer5E-Kanal (633 nm, rot) gemacht und die Kanäle übereinander gelegt (beispielhaft Karpas299 Zellen mit SH313-B5-hFc-CypHer5E: Abbildung 4-25).

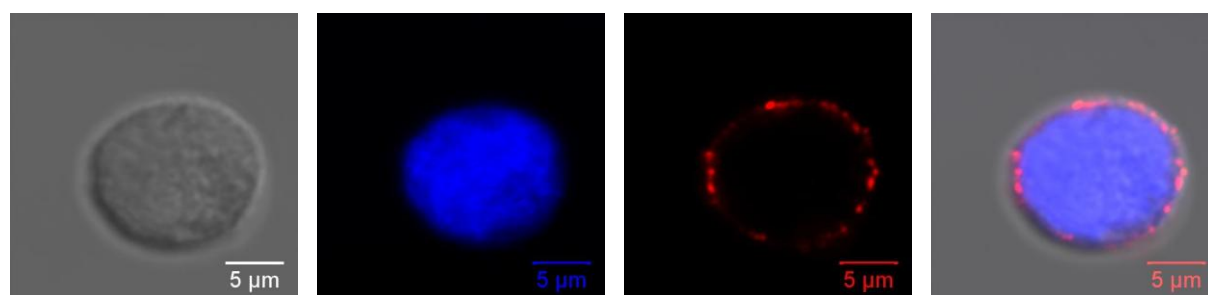


Abbildung 4-25: Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Internalisierung des CD30-spezifischen Antikörpers SH313-B5-hFc-CypHer5E in CD30⁺ Karpas299 Zellen. Kanäle von links nach rechts: Hellfeld, DAPI, CypHer5E, Überlagerung aller drei Kanäle.

Die Internalisierung der ImmunRNasen ist durch die Überlagerung des DAPI- und des CypHer5E-Kanals visualisiert (Abbildung 4-26). Die Ergebnisse korrelierten mit den Ergebnissen des durchflusszytometrischen Internalisierungsnachweises. Für die CD30-spezifischen ImmunRNasen und den Antikörper SH313-B5-hFc wurde eine deutliche punktuelle Rotfärbung der CD30⁺ Karpas299 Zellen im Bereich des Zytoplasmas detektiert. Sämtliche Kontrollen wiesen entweder keine signifikante oder gar keine Färbung auf.

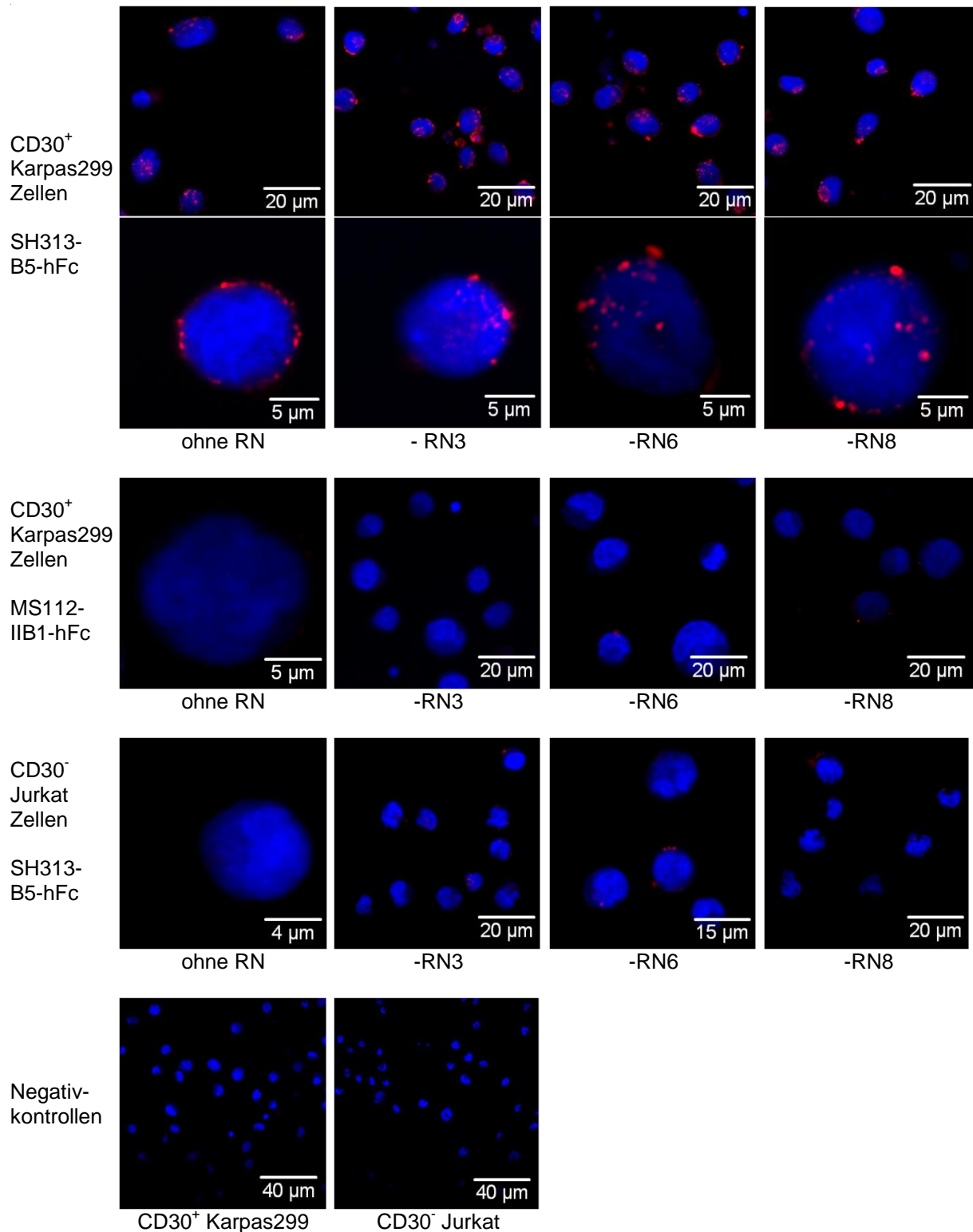


Abbildung 4-26: Nachweis der Internalisierung des Antikörpers SH313-B5-hFc und der ImmunRNasen SH313-B5-hFc-Ad_{mc}-RN3, -RN6, -RN8 in Lymphomzellen mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie

Visualisierung der Internalisierung der Proteine in CD30⁺ Karpas299 und CD30⁻ Jurkat Zellen mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie. Der Antikörper SH313-B5-hFc und die ImmunRNasen mit dem spaltbaren Adapter SH313-B5-hFc-Ad_{mc}-RN3, -RN6 und -RN8 bzw. die entsprechenden Proteine mit dem Kontrollantikörper MS112-IIB1-hFc wurden mit dem pH-sensitiven Farbstoff CypHer5E (rot bei pH <7) markiert. Es wurden $1 \cdot 10^5$ Zellen mit 2 µg der markierten Proteine für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach einem Austausch des Mediums wurden die Zellen weitere 4 h kultiviert. Die Zellen wurden auf Deckgläschen überführt, fixiert und die Zellkerne mit DAPI (blau) gefärbt. Für die Darstellung der Zellkerne (DAPI) wurde ein Laser mit 364 nm Wellenlänge und für die Darstellung der Internalisierung (CypHer5E) ein Laser mit 633 nm Wellenlänge verwendet.

4.4.10 Analysen zum Einfluss der ImmunRNasen mit dem Glycin-Serin-Linker auf die Viabilität von CD30⁺ Lymphomzellen

Für die ImmunRNasen mit dem spaltbaren Adapter Ad_{mc} wurde im Vergleich zu dem unfusionierten Antikörper SH313-B5-hFc kein stärkerer Effekt auf die Viabilität bzw. das Wachstum der CD30⁺ Lymphomzellen detektiert. Für einen Vergleich der Linker wurde der Einfluss der ImmunRNasen SH313-B5-hFc-RN1-8 mit dem flexiblen Glycin-Serin-Linker analysiert (Abbildung 4-27).

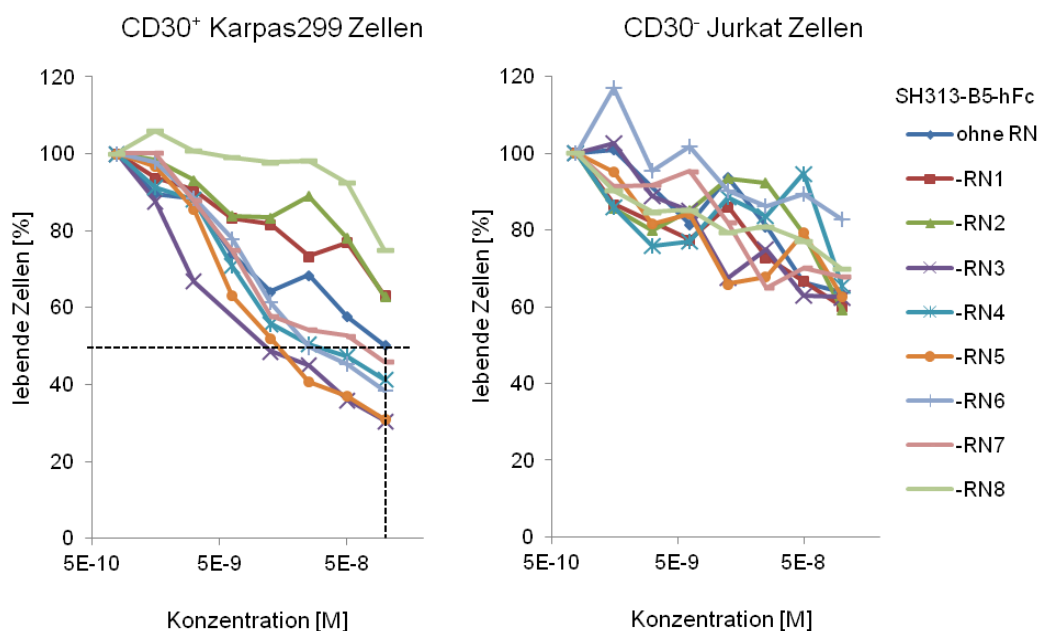


Abbildung 4-27: MTT-Test nach Inkubation von Lymphomzellen mit den ImmunRNasen SH313-B5-hFc-RN1-8

Ermittlung des Einflusses der ImmunRNasen SH313-B5-hFc-RN1-8 und des Antikörpers SH313-B5-hFc auf die Viabilität und das Wachstum von CD30⁺ Karpas299 und CD30⁻ Jurkat Zellen. Es wurden $5 \cdot 10^3$ Zellen pro *well* eingesät und die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach 18 h wurden die Proteine in Konzentrationen von $1 \cdot 10^{-7}$ bis $8 \cdot 10^{-10}$ M in insgesamt 100 µL Kultivierungsmedium zugefügt (jeweils Duplikate). Nach 72 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde die MTT-Lösung (5 mg/mL) zugegeben und für weitere 4 h inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend mit saurem Isopropanol gestoppt und das Ergebnis bei einer Wellenlänge von 570 nm vermessen.

Der Antikörper SH313-B5-hFc wies bereits ohne RNase einen starken Einfluss auf die Viabilität bzw. das Wachstum der CD30⁺ Karpas299 Zellen auf, da bei der höchsten eingesetzten Konzentration von $1 \cdot 10^{-7}$ M nur noch ~50 % lebender Zellen vorhanden waren. Die Fusion der RNasen 3, 4, 5, 6 und 7 verstärkte diesen Effekt, während er durch die Fusion der RNasen 1, 2 und 8 deutlich vermindert wurde. Die Effekte auf die Zellen waren stärker als bei den ImmunRNasen mit dem spaltbaren Adapter Ad_{mc}.

Sowohl die ImmunRNasen als auch der Antikörper SH313-B5-hFc hatten einen Effekt auf die Viabilität bzw. das Wachstum der CD30⁻ Jurkat Zellen. Dieser war jedoch deutlich weniger stark ausgeprägt und konnte erst bei höheren Konzentrationen nachgewiesen werden. Außerdem schwankten hier die Werte stärker.

Da sich die ImmunRNase SH313-B5-hFc-RN3 besonders stark auf die Viabilität der CD30⁺ Zellen auswirkte, wurde sie in einem weiteren unabhängigen Versuch in einem breiteren Konzentrationsspektrum untersucht. Als Kontrolle wurde das entsprechende Fusionsprotein mit dem Kontrollantikörper MS112-IIB1-hFc analysiert (Abbildung 4-28).

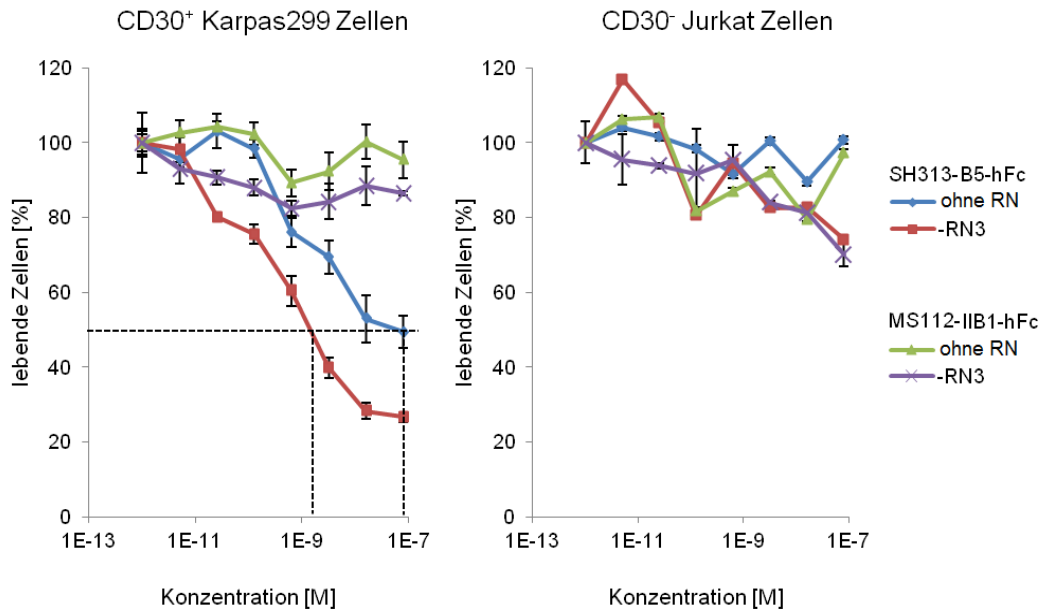


Abbildung 4-28: MTT-Test nach Inkubation von Lymphomzellen mit der ImmunRNase SH313-B5-hFc-RN3 und Kontrollen

Ermittlung des Einflusses der ImmunRNase SH313-B5-hFc-RN3 und der Kontroll-ImmunRNase MS112-IIB1-hFc-RN3 sowie der entsprechenden Antikörper ohne RNase auf die Viabilität bzw. das Wachstum von CD30⁺ Karpas299 und CD30⁻ Jurkat Zellen. Es wurden $5 \cdot 10^3$ Zellen/well eingesät und die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach 18 h wurden die Proteine in Konzentrationen von $1 \cdot 10^{-7}$ - $1 \cdot 10^{-12}$ M in insgesamt 100 µL Kultivierungsmedium zugefügt (jeweils Triplikate). Nach 72 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde die MTT-Lösung (5 mg/mL) zugegeben und für weitere 4 h inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend mit saurem Isopropanol gestoppt und das Ergebnis bei einer Wellenlänge von 570 nm vermessen.

Die in Abbildung 4-27 gezeigten Ergebnisse konnten durch diesen weiteren MTT-Test verifiziert werden. Der Antikörper SH313-B5-hFc ohne RNase vermittelte bereits einen starken Effekt auf die Zellviabilität und das Wachstum der CD30⁺ Karpas299 Zellen. Er bewirkte bei einer Proteinkonzentration von $\sim 1 \cdot 10^{-7}$ M einen Rückgang der lebenden Zellen auf 50 %. Für die ImmunRNase SH313-B5-hFc-RN3 wurde ein noch stärkerer Einfluss ermittelt. Bei einer Proteinkonzentration von $\sim 1 \cdot 10^{-9}$ M wurde ein Rückgang der lebenden Zellen auf 50 % detektiert. Dies entsprach einer 100-fach stärkeren Wachstumsinhibition.

Die entsprechenden Proteine mit dem Kontrollantikörper MS112-IIB1 vermittelten keinen Einfluss auf die Viabilität der CD30⁺ Zellen. Auf die CD30⁻ Jurkat Zellen konnte ein schwacher Effekt durch beide Fusionsproteine mit RNase3 festgestellt werden, der aber erst bei höheren Proteinkonzentrationen deutlich wurde. Die Zahl der lebenden Zellen wurde durch Proteinkonzentrationen $> 2 \cdot 10^{-8}$ M auf ~70 % reduziert.

5 Diskussion

Maligne Lymphome weisen in Deutschland eine steigende Zahl an Neuerkrankungen auf. Während die Zahl der HL-Neuerkrankungen relativ konstant bleibt, ist jedoch ein deutlicher Anstieg der NHL-Fälle zu verzeichnen [94]. Die letzte Gruppe weist zudem mit 43 % eine enorm hohe Sterberate auf [72, 94]. Die effektive Behandlung von HL und NHL stellt noch immer eine Herausforderung dar. Chemotherapie und Bestrahlung zeigen zwar bei einem Großteil der Patienten gute Wirkung mit hohen Heilungschancen, sind aber mit massiven Nebenwirkungen sowie Spätfolgen verbunden und versagen bei einigen Erkrankten komplett [78, 95-97]. Weiterhin ist die Rückfallquote mit 20-30 % sehr hoch und für diese Fälle sind die Heilungschancen nur noch gering [68, 96]. Aus diesen Gründen besteht ein dringender Bedarf an verbesserten alternativen Therapieformen.

Da bei den HL und einigen NHL wie dem ALCL das Antigen CD30 auf der Zelloberfläche überexprimiert ist und dessen normale Expression nur auf aktivierten Lymphozyten und wenigen anderen Zellarten stattfindet, stellt es als Tumormarker ein ideales Ziel für Immuntherapien dar [68-71, 98, 99]. Die meisten unkonjugierten Antikörper und Immunkonjugate mit bakteriellen oder pflanzlichen Toxinen versagen aber in klinischen Studien aufgrund geringer Effektivität oder starker Nebenwirkungen. Durch deren nicht-humane Bestandteile können Immunreaktionen bei Patienten ausgelöst werden, während andere Probleme wie das *Vascular-Leak*-Syndrom durch die unspezifische Toxizität der Effektordomänen verursacht werden [4, 75, 92].

Eine vielversprechende Alternative kann der Einsatz von ImmunRNasen bieten, die aus humanen Proteinkomponenten aufgebaut werden können und daher keine Immunogenität aufweisen. Die Spezifität für das Antigen wird dabei durch einen humanen Antikörper vermittelt, während sich die enzymatisch aktiven RNasen der humanen RNase A Superfamilie als katalytische Domäne eignen. Die zytotoxische Wirkung der RNase entfaltet sich erst intrazellulär nach der Internalisierung in die Zielzelle [4].

In dieser Arbeit wurden die acht katalytisch aktiven humanen RNasen 1-8 sowie vier neue CD30-spezifische Antikörper rekombinant hergestellt und im Hinblick auf den Einsatz in ImmunRNasen zur Therapie von CD30⁺ Lymphomen charakterisiert. Der Antikörper mit den vielversprechendsten Eigenschaften wurde anschließend mit diesen RNasen über verschiedene Linkerpeptide fusioniert und die ImmunRNasen hinsichtlich ihrer Wirkung auf Lymphomzellen untersucht.

5.1 Produktion und biochemische Charakterisierung der humanen RNasen 1-8

Da für die Wirkung von ImmunRNasen die enzymatische Aktivität der RNasen von entscheidender Bedeutung zu sein scheint [6, 32, 33], wurden für diese Arbeit die katalytisch aktiven RNasen 1-8 der humanen RNase A Superfamilie ausgewählt. Diese acht klassischen RNasen teilen wesentliche Strukturmerkmale, weisen aber beispielsweise große Unterschiede in ihrer enzymatischen Aktivität auf [5]. Bisher gibt es noch keine Studie, die diese RNasen 1-8 vergleichend charakterisiert und für ImmunRNasen ausgetestet hat.

Die RNasen 9-13 der humanen RNase A Superfamilie weisen hingegen keine enzymatische Aktivität auf [18] und wurden deshalb nicht als potentielle Effektdomäne in ImmunRNasen für diese Arbeit einbezogen.

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war die vergleichende Untersuchung der humanen RNasen 1-8 hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaften. Dafür mussten sie zunächst rekombinant hergestellt werden.

Eine häufig verwendete Methode zur RNaseexpression ist die bakterielle Produktion in *Inclusion Bodies*, die meist in *E. coli* durchgeführt wird und eine anschließende *in vitro* Rückfaltung der Proteine erfordert [100-104]. Für die bovine RNase A sind mit dieser Methode sehr gute Ergebnisse mit hohen Ausbeuten erzielt worden [103, 104], die auch auf die humane pankreatische RNase (RNase1) übertragen werden konnten [10, 102, 104].

In einer mitbetreuten Masterarbeit wurde die Produktion der humanen RNasen 1-8 in *E. coli* untersucht [105]. Eine periplasmatische Produktion war nicht möglich und auch die Produktion in *Inclusion Bodies* mit einer anschließender Rückfaltung war nur für einige RNasen erfolgreich, während bei den übrigen durch die Rückfaltungsschritte hohe Ausbeuteverluste zu verzeichnen waren. Im Vergleich zu den später in Säugerzellen rekombinant produzierten RNasen wiesen die bakteriell hergestellten immer eine stark verringerte ribonukleolytische Aktivität auf. Sie war z.B. für die humane RNase1 um den Faktor 100 geringer. Ob dies eine Folge von fehlerhaft rückgefaltetem Protein oder fehlenden posttranslationalen Modifikationen war, konnte nicht geklärt werden. Glykosylierungen können einen Einfluss sowohl auf die ribonukleolytische Aktivität als auch auf die Hemmung dieser durch den RI haben, da Protein-Protein-Interaktionen durch die veränderte Oberflächenstruktur der RNase beeinflusst werden [106, 107].

Für eine effektivere Produktion mit korrekter Ausbildung der Disulfidbrücken-gestützten Tertiärstruktur der RNasen 1-8 [5] und Glykosylierungen der RNasen 1, 2, 3, 6 und 7 [5, 14, 18, 21-28, 102, 108] wurden die weiteren Expressionen nur in Säugerzellen durchgeführt.

Für die Expression der humanen RNasen 1-8 in HEK293 T Zellen wurden mehrere neue Strategien verfolgt. Sie sollten mit einem aminoterminalen murinen Immunglobulin Signalpeptid anstelle des natürlichen Signalpeptids der RNasen produziert werden. Bei dieser Expression wurde aber keine sekretorische Produktion der RNasen nachgewiesen, obwohl murine Ig Signalpeptide für ihre effektive Sekretionsrate bekannt sind [109]. Da die humanen RNasen 1-8 selbst über ein Sekretionssignalpeptid verfügen und als extrazelluläre Proteine beschrieben sind [5], wurden sie anschließend mit ihrem jeweiligen Wildtyp-Signalpeptid produziert. Bei dieser Expression konnten aber nur die RNasen 1, 2, 4 und 5 erfolgreich aus dem Kulturüberstand gereinigt werden, während für die übrigen RNasen 3, 6, 7 und 8 keine sekretorische Produktion stattfand. Die ineffektive Sekretion kann eventuell auf Missfaltungen und Aggregation der RNasen in der Wirtszelle zurückgeführt werden [109]. Weiterhin werden die RNasen 3 und 6 nach einer früheren Einteilung den nicht-sekretorischen RNasen zugeordnet [5, 20, 110]. Sie verfügen zwar über ein Sekretionssignalpeptid, werden aber möglicherweise nicht nach dem klassischen Mechanismus sekretiert, sondern akkumulieren in Vesikeln.

Die Fusion von Komponenten wie dem Fc-Teil eines Antikörpers erhöht die Expressionsrate von sekretorischen Proteinen, wobei dieser Effekt von beiden Fusionspartnern abhängig ist [109]. Durch das erhöhte Expressionslevel kann auch die effektive Sekretion verbessert werden. Außerdem kann die Fusion eines Fc-Teils nicht nur die Ausbeute, sondern auch die Löslichkeit des gesamten Fusionsproteins erhöhen [111] und ermöglicht weiterhin eine effektive Reinigung des Fusionsproteins mittels Protein A Affinitätschromatographie. Für eine verbesserte sekretorische Produktion wurden die RNasen 1-8 daher an den humanen Fc-Teil eines IgG1-Antikörpers fusioniert. Mit dieser Methode konnten sie als Fusionsproteine produziert und gereinigt werden.

Nach der Produktion und Reinigung sollten die RNasen 1-8 proteolytisch von dem Fc-Teil abgespalten werden. Dafür war eine Protease-Schnittstelle (TEV_{cs}) zwischen RNase und Fc-Teil integriert worden, deren Spaltung durch die TEV-Protease als sehr zuverlässig gilt [109]. In dieser Arbeit wurde für die Schnittstelle die Sequenz ENLYFQ|G verwendet, die hochspezifisch von der TEV-Protease erkannt wird [111-114]. Da die Spaltung zwischen Q und G stattfindet [111-113], verbleibt nur ein zusätzliches Glycin am N-Terminus der RNasen [111]. Die proteolytische Spaltung der RNase von dem Fc-Teil mittels TEV-Protease führte nur für die RNasen 1, 4, 5 und 7 zu so hohen Ausbeuten an RNase, dass eine Separation von dem Fc-Teil und der Protease mittels präparativer Größenausschlusschromatographie möglich war. Für die RNasen 2, 3, 6 und 8 war die Abspaltung entweder ineffektiv, führte zu Spaltprodukten mit diversen Größen zwischen ~15 kDa und ~30 kDa oder zum kompletten Verlust der RNase, was möglicherweise auf proteolytische Degradationen zurückzuführen war. Aufgrund der hohen Spezifität der TEV-Protease sollte eine unspezifische Spaltung

der Fusionsproteine hFc-TEV_{cs}-RNase2, 3, 6 oder 8 innerhalb des Proteins durch diese Protease allerdings ausgeschlossen sein [115]. Es ist aber möglich, dass eine Kontamination der Proben mit zellulären Proteasen zur Proteolyse geführt hat.

Weiterhin könnten die voneinander abgespaltenen Proteine sofort nach der Spaltung aggregiert [114] und somit präzipitiert sein. Zudem ist beschrieben, dass die Effektivität der Abspaltung der Fusionspartner von Protein zu Protein variiert und eine Abspaltung für einige Proteine gar nicht funktioniert [109]. Der Grund hierfür kann eine sterische Behinderung sein, die den Zugang der TEV-Protease zu der Schnittstelle verhindert [114]. Aus diesem Grund sollte die Schnittstelle zwischen zwei Proteindomänen eingefügt werden und ein zusätzlicher flankierender Linker einen verbesserten Zugang der Protease zu der Schnittstelle gewährleisten.

Als Alternative wurde beispielhaft für die RNase2 eine Enterokinase-Schnittstelle zwischen RNase und Fc-Teil integriert und nach der Produktion und Reinigung die Abspaltung der RNase mittels Enterokinase untersucht. Auch diese Methode war nicht erfolgreich, sondern führte zu dem gleichen Ergebnis wie die Spaltung mit der TEV-Protease (nicht gezeigt).

Nach der Produktion wurden die ribonukleolytischen Aktivitäten der RNasen 1, 4, 5 und 7 gegenüber zwei Substraten mit unterschiedlichem Pyrimidin (Uracil oder Cytosin) analysiert, um die Substratpräferenzen zu ermitteln und die Aktivitäten untereinander und mit Daten aus anderen Arbeiten zu vergleichen. Ein Vergleich der Ergebnisse ist allerdings nur unter Vorbehalt möglich, da die Literaturdaten meistens auf bakteriell produzierten und rückgefalteten RNasen beruhen [87, 116], d.h. die RNasen möglicherweise nicht vollständig rückgefaltet vorlagen und unglykosyliert waren. Die Tests zur Bestimmung der Enzymaktivität der RNasen unterscheiden sich ebenfalls methodisch und durch die eingesetzten Substrate. Neben den einzelsträngigen Substraten Uridyl-/Cytidyl-3'-5'-Adenosin (UpA/CpA) [28] und Poly(U/C) [116] wurde Hefe tRNA [117] als Substrat eingesetzt, welche einzel- und doppelsträngige Bereiche aufweist. Die letztgenannten beiden Substrate haben mehrere potentielle Schnittstellen, während die in dieser Arbeit verwendeten einzelsträngigen Substrate nur eine Schnittstelle aufwiesen und somit die exakte Bestimmung der Kinetik erlaubten.

Für die RNase1 ließ sich mit $\sim 2,0 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ die höchste Enzymeffizienz unter den analysierten RNasen nachweisen, die an den Wert der bovinen RNase A von $3,6 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ heranreicht [87]. Die RNase1 wies in anderen Arbeiten auch gegenüber Poly(U) bzw. Poly(C) sehr hohe Aktivitäten auf [104, 110, 116]. So ermittelten Rehman *et al.* einen Wert von $\sim 2,8 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ gegen Poly(C) [116], der sehr exakt mit den in dieser Arbeit ermittelten Werten für das Cytidin- und Uridin-haltige Substrat übereinstimmt. Da die von Rehman *et al.* analysierte RNase1 in *E. coli* hergestellt war [116] und die Werte für die Enzymeffizienz

nahezu übereinstimmen, ist ein Einfluss der Glykosylierung auf die Aktivität der RNase1 unwahrscheinlich. Eine Substratpräferenz für Cytidin oder Uridin konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden, obwohl eine Präferenz für Cytidin beschrieben ist [104, 110].

Für die RNase4 konnte die zweithöchste Enzymeffizienz ermittelt werden, die je nach Substrat $8,7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (C) und $2,3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (U) betrug. Der fast dreimal höhere Wert für das Uridin-haltige Substrat bestätigt die in der Literatur beschriebene starke Präferenz für Uridin [24, 28]. Hofsteenge *et al.* beschreiben allerdings eine noch deutlichere Präferenz der RNase4 für Uridin-haltige Substrate. Sie ermittelten Enzymeffizienzen von $2,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (UpA) bzw. $6,3 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (CpA) [28], was einer 1000-fach höheren Aktivität gegenüber dem Uridin-haltigen Substrat entspricht. Dieser Faktor wurde auch in anderen Arbeiten nachgewiesen [14]. Die Präferenz für Uridin-haltige Substrate ist durch den verkürzten C-Terminus der RNase4 bedingt, der an der Ausbildung des Aktiven Zentrums beteiligt ist, dessen sterische Form Uridin-haltige Substrate gegenüber Cytidin-haltigen Substraten begünstigt [14, 28].

Für die RNase5 wurde eine schwache Präferenz für das Uridin-haltige Substrat nachgewiesen. Die Enzymeffizienz war mit $9,4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ doppelt so hoch wie für das Cytidin-haltige Substrat. Diese Daten widersprechen der in der Literatur angegebenen Präferenz für Cytidin gegenüber Uridin [13, 87]. Weiterhin war die ermittelte Aktivität für die RNase5 im Vergleich zu den anderen RNasen 1, 4 und 7 zwar sehr niedrig, aber dennoch 100-fach höher als die beschriebenen Aktivitäten von $3,3 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (U) und $5,4 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (C), die mit bakteriell produzierter RNase5 ermittelt wurden [87].

Für die RNase7 wurde eine eindeutige Präferenz für das Cytidin-haltige Substrat ermittelt. Die Enzymeffizienz war mit einem Wert von $1,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ fast viermal so hoch wie die für das Uridin-haltige Substrat. Harder *et al.* ermittelten für RNase7, die aus menschlicher Epidermis isoliert wurde, eine Enzymeffizienz von $\sim 2,3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Dieser Wert übersteigt den in dieser Arbeit gemessenen Wert für das Cytidin-haltige Substrat um den Faktor 10, wurde aber gegenüber Hefe tRNA als Substrat ermittelt [117].

Die starke Bindung des zytosolischen RI an die RNasen der RNase A Superfamilie mit Affinitäten im femtomolaren Bereich [7, 11, 34] ist für die Zytotoxizität der RNasen von entscheidender Bedeutung. Zum Einen wird die ribonukleolytische Aktivität gehemmt, zum Anderen können aber auch andere biologische Funktionen der RNasen durch sterische Behinderungen inhibiert oder zumindest abgeschwächt werden [5]. Es ist beschrieben, dass eine geringe Affinität zum RI die zytotoxische Wirkung von RNasen der RNase A Superfamilie erhöht. Beim Austausch einzelner Aminosäuren der bovinen RNase A sowie der humanen RNasen 1 und 2 wurde die Bindung durch den RI abgeschwächt und daher eine stärkere Zytotoxizität erhalten [34, 104, 118, 119]. Weiterhin sind stark zytotoxische RNasen

wie z.B. Onconase gegenüber dem RI unempfindlich. Der RI hat eine 1000-fach niedrigere Affinität für Onconase als z.B. für die humane RNase1 [104, 118, 120, 121].

Für die untersuchten RNasen 1, 4, 5 und 7 wurden sehr unterschiedliche Ergebnisse zur Inhibition der ribonukleolytischen Aktivität durch den humanen RI ermittelt. Während die Aktivität der RNase4 erst bei 20-fachem molarem Überschuss an RI vollständig gehemmt werden konnte, wurde die der RNase5 bereits von äquimolaren Mengen an RI komplett inhibiert. Eine derartig starke Hemmung der RNase5 durch den RI ist bekannt [5, 118]. Der K_i -Wert für RNase5 ist mit 0,7 fM fast 6-fach geringer als der Wert für die RNase4 (4 fM). Beide werden deutlich stärker als die bovine RNase A gebunden, für die ein K_i -Wert von 67 fM ermittelt wurde [28].

Für die RNasen 1 und 7 wurde interessanterweise keine vollständige Hemmung der ribonukleolytischen Aktivität durch den RI nachgewiesen. Die Aktivität der RNase7 wurde sowohl durch eine äquimolare Menge sowie durch einen 5-fachen molaren Überschuss an RI nur auf ~60 % reduziert. Für die RNase1 konnte sogar nur eine Reduktion der Aktivität auf ~80 % ermittelt werden, die unabhängig von der Menge an eingesetztem RI war (äquimolar, 5- und 20-facher molarer Überschuss). Diese Ergebnis entspricht nicht den Erwartungen, da für die RNase1 eine starke Hemmung der ribonukleolytischen Aktivität durch den RI beschrieben ist [104, 118].

Das Phänomen der partiellen Hemmung könnte durch Glykosylierungen der RNasen 1 und 7 bedingt sein. Das Vorhandensein oder Fehlen von Glykosylierungen an Proteinen kann die Protein-Protein-Interaktion und dadurch die Affinität beeinflussen sowie biologische Effekte, die durch die Bindung ausgelöst werden, verändern [122]. Es ist bekannt, dass die RNase1 sowohl als unglykosyliertes als auch als glykosyliertes Protein produziert wird und je nach Gewebe, aus dem sie isoliert wird, ganz unterschiedliche Arten und Ausmaße von Glykosylierungen aufweist [108, 123]. Russo *et al.* haben die RNase1 in CHO-Zellen produziert und in SDS-PAGEs zwei unterschiedlich große Banden detektiert, die aber beide der RNase1 zugeordnet werden konnten und ribonukleolytische Aktivität aufwiesen. Bei einem Protein handelte es sich um die unglykosylierte Form der RNase1, während die andere Bande heterogen glykosylierte Formen der RNase1 umfasste [123]. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden bei der Reinigung der RNase1 mittels Größenausschlusschromatographie zwei Peaks detektiert, deren Fraktionen in der SDS-PAGE verschiedene molare Massen aufwiesen. Für alle untersuchten Proben aus den beiden Peaks konnte ribonukleolytische Aktivität nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Weiterhin konnten auch beide Banden mittels anti-RNase1 Immunfärbung als humane RNase1 identifiziert werden. Dies lässt darauf schließen, dass die RNase1 in heterogen glykosylierten Formen produziert wurde. Es ist denkbar, dass diese verschiedenen glykosylierten Formen der RNase1 unterschiedlich stark oder gar nicht von dem RI gebunden und inhibiert werden. Die in anderen

Arbeiten beschriebene Hemmung der Aktivität bakteriell hergestellter RNase1 durch den RI [104] lag demzufolge möglicherweise an ihrem unglykosylierten Zustand.

Für die RNasen 4, 5 und 7 wurde bei der Reinigung mittels Größenausschlusschromatographie jeweils nur eine Proteinbande in der SDS-PAGE nachgewiesen, so dass von keiner Glykosylierung oder von einer homogenen Glykosylierung ausgegangen werden musste. Die RNasen 4 und 5 sind unglykosylierte Proteine [5, 14, 29], wohingegen die RNase7 als glykosyliertes Protein beschrieben ist [29]. Interessanterweise wurden tatsächlich die unglykosylierten RNasen 4 und 5 vollständig durch den RI gehemmt, während für RNase7 ähnlich wie für RNase1 nur eine Reduktion der Aktivität auf einen konstanten Wert detektiert wurde.

Die Glykosylierungen der RNasen scheinen demnach einen Einfluss auf die Wechselwirkung mit dem RI zu haben und die Inhibition dadurch verhindern oder zumindest abschwächen zu können.

Die humanen RNasen 1-8 ließen sich in Säugerzellen nur mit geringen Ausbeuten oder gar nicht produzieren, aber nach Fusion an den C-Terminus des humanen IgG1-Fc-Teils war die Produktion als Fusionsproteine möglich. Die proteolytische Abspaltung über eine zwischen Fc-Teil und RNase eingefügte TEV-Schnittstelle war für die RNasen 1, 4, 5 und 7 erfolgreich. Diese RNasen wiesen ribonukleolytische Aktivität auf und wurden verschieden stark von dem RI gehemmt, was wahrscheinlich durch ihre unterschiedlichen Glykosylierungen beeinflusst wurde.

Da sich die humanen RNasen 1-8 zumindest als Fusionsproteine produzieren ließen, wurden sie alle als Effektordomäne für die ImmunRNasen eingesetzt.

5.2 Produktion und Charakterisierung neuer CD30-spezifischer Antikörper

Der in einer vorangegangenen Arbeit verwendete Antikörper 4E3 aus der semi-synthetischen scFv-Genbibliothek Tomlinson I/J hat nur eine sehr niedrige Affinität von $6 \cdot 10^{-7}$ M für CD30 [57] und war für eine therapeutische Weiterentwicklung ungeeignet. Deshalb wurden neue CD30-spezifische Antikörper mittels Antikörperphagendisplay gegen die extrazelluläre Domäne des humanen CD30 aus den naiven humanen Antikörpergenbibliotheken HAL4 und HAL7 isoliert. Es wurden vier Antikörper erhalten, die zunächst als scFv-Fragment und scFv-Fc Antikörper produziert wurden und deren Bindung an das Antigen CD30 im Vergleich zu dem Antikörper 4E3 untersucht wurde.

Die neuen CD30-spezifischen Antikörper SH313-B5, -F9, -G9 und -H4 ließen sich sowohl als scFv-Fragment in *E. coli* wie auch als scFv-Fc Antikörper in HEK293 T Zellen in hohen Ausbeuten produzieren und effizient reinigen. Hohe Ausbeuten an funktionalem Antikörper und die effektive Reinigung sind für einen Einsatz von Antikörpern im therapeutischen Bereich bereits erste wichtige Auswahlkriterien [124].

Neben der Produzierbarkeit sind die Bindungseigenschaften der Antikörper wichtig, die von der Antikörperstruktur und der Affinität für das Antigen CD30 sowie der Konformation des erkannten Epitops abhängen. Daher wurden zunächst die Epitopkonformation und die Antikörperbindung an rekombinantes CD30 sowie an CD30⁺ Lymphomzellen untersucht.

Der Antikörper SH313-B5 erkannte ein lineares Epitop, während die anderen Antikörper SH313-F9, -G9 und -H4 ein konformationelles Epitop erkannten, das nach Denaturierung von CD30 unter reduzierenden Bedingungen verloren ging.

Die Bindungsstudien wurden mittels ELISA mit monovalenten scFv-Fragmenten bzw. bivalenten scFv-Fc Antikörpern durchgeführt. Mit beiden Antikörperformaten wurde dieselbe Reihenfolge der Bindungsstärken ermittelt. Auch die Untersuchungen von CD30⁺ Karpas299 Zellen mittels Durchflusszytometrie ergaben die gleiche Reihenfolge der Bindungsstärken wie im ELISA, so dass auf eine ähnliche Struktur des rekombinanten und des nativen CD30 geschlossen werden konnte. In allen Untersuchungen wurde für den Antikörper SH313-B5 die stärkste Bindung an das Antigen CD30 nachgewiesen, während für den Antikörper SH313-G9 die schwächste Bindung detektiert wurde. Es wurde keine unspezifische Bindung an BSA im ELISA oder an CD30⁻ HD-MY-Z Lymphomzellen bei den durchflusszytometrischen Analysen nachgewiesen. Dies ist für einen potentiellen therapeutischen Einsatz von großer Bedeutung, da eine unspezifische Bindung an nicht-Targetzellen im Körper zu peripherer Toxizität führen kann [46, 47].

Die Affinitäten der scFv-Fragmente wurden mittels Oberflächenplasmonenresonanz für das rekombinante Antigen CD30 ermittelt und korrelierten mit den Daten aus ELISA und Durchflusszytometrie. Für die drei Antikörper SH313-B5, -F9 und -H4 wurden vergleichbare Affinitäten zwischen $1,6 \cdot 10^{-8}$ M und $3,3 \cdot 10^{-8}$ M ermittelt, während für den Antikörper SH313-G9 eine um den Faktor 10 geringere Affinität von $2,0 \cdot 10^{-7}$ M erhalten wurde. In der Literatur sind Affinitäten in der Größenordnung von $\sim 10^{-8}$ M für andere tumorspezifische humane scFv-Fragmente bzw. Immunkonjugate beschrieben. Nagata *et al.* ermittelten z.B. für ihr CD30-spezifisches scFv-Immuntoxin CL2(scFv)-PE38 eine Affinität von $5,6 \cdot 10^{-8}$ M [125, 126].

Eine hohe Affinität für ein tumorassoziiertes Antigen wie CD30 ist für den therapeutischen Einsatz des Antikörpers bzw. der ImmunRNasen von Vorteil. Der Wirkstoff wird durch eine schnelle Assoziation rasch aus dem Blut an den Tumor abgegeben und die Wirkstoffkonzentration am Tumor durch eine langsame Dissoziation erhöht, wodurch die Gefahr einer unspezifischen toxischen Reaktion verringert wird [122, 127, 128]. Eine zu hohe Affinität der Antikörper über 10^{-9} M kann aber das Durchdringen von soliden Tumoren verschlechtern, da der Antikörper in den perivaskulären Regionen des Tumors verbleibt [47, 128]. Lymphome werden zwar zu den liquiden Tumoren gezählt, aber die Tumorherde wachsen in den Lymphknoten in verschiedenen Organen und Geweben und formen große Tumormassen, die in ihrer Struktur und Morphologie den soliden Tumoren sehr ähnlich sind [68]. Die optimale Affinität für das Antigen liegt demnach zwischen 10^{-7} M und 10^{-8} M, da diese für eine spezifische Zellbindung ausreicht und dennoch eine effektive Tumورpenetration gewährleistet [128]. Die biologischen Effekte, die bei der Bindung eines tumorassoziierten Rezeptors wie CD30 ausgelöst werden, müssen aber nicht zwangsläufig durch die Affinität des Liganden beeinflusst werden, da die Liganden-Rezeptor-Affinität nicht automatisch mit der biologischen Aktivität korreliert [129]. Die Affinität eines Liganden für seinen Rezeptor beeinflusst auch die Vorgänge nach der rezeptorvermittelten Endozytose des Komplexes in den Endosomen. Während hochaffine Liganden eher zum Abbau in die Lysosomen gelangen, können Liganden mit niedrigeren Affinitäten komplett aus der Zelle ausgeschleust werden und erneut einen Rezeptor stimulieren [129].

Im Vergleich zu dem CD30-spezifischen Antikörper 4E3, der in einer vorangegangenen Arbeit charakterisiert und in ImmunRNasen eingesetzt wurde [57, 76], wiesen die neuen Antikörper SH313-B5, -F9, -G9 und -H4 deutlich verbesserte Eigenschaften hinsichtlich der Bindungsstärke und Affinität für CD30 auf. In dieser Arbeit wurde für das monovalente scFv-Fragment 4E3 eine Affinität von $6,1 \cdot 10^{-6}$ M ermittelt. Menzel *et al.* ermittelten eine 10-fach höhere Affinität von $5,7 \cdot 10^{-7}$ M für dieses scFv-Fragment, wobei die Auswertung nicht mit einem kinetischen, sondern mit einem *steady-state* Modell durchgeführt wurde [57] und

daher keine vergleichbaren Daten lieferte. Für den scFv-Fc Antikörper ermittelten Menzel *et al.* eine Affinität von $6,7 \cdot 10^{-9}$ M [57, 76]. Auch diese Methode eignet sich nicht zur Bestimmung der Affinität, da ein scFv-Fc Antikörper bivalent ist und Kinetiken mit monovalenten Antikörpern ermittelt werden müssen.

Die Bildung von Dimeren, Multimeren und Aggregaten der scFv-Fragmente hat einen Einfluss auf die Bindung an und Avidität für CD30, da dadurch die Valenz der Antikörper verändert wird. Weiterhin ist die Aggregatbildung ein sehr kritischer Faktor für einen möglichen therapeutischen Einsatz, da Aggregate die Immunogenität von therapeutischen Proteinen erhöhen [46, 47, 130]. Eine lange Lagerung der Proteine kann die Bildung von Multimeren und Aggregaten fördern [36]. Die scFv-Fragmente SH313-B5, -F9 und -H4 wurden mittels Größenausschlusschromatographie auf ihre Neigung zur Ausbildung von Dimeren und Multimeren untersucht. Für alle drei untersuchten scFv-Fragmente wurde eine ähnliche Verteilung von Mono-, Di- und Multimeren erhalten, so dass ein Vergleich der Ergebnisse der Affinitätsbestimmung untereinander möglich war. Für den Antikörper SH313-B5 wurde aber mit ~80 % gegenüber den Antikörpern SH313-F9 und SH313-H4 mit ~60 % ein größerer Anteil an Monomeren detektiert.

Der Antikörper SH313-B5 wurde als *Targeting*-Domäne für die ImmunRNasen ausgewählt, da er im Vergleich zu den anderen untersuchten Antikörpern die besten Bindungseigenschaften kombiniert mit einer hohen Affinität für das Antigen CD30 aufwies.

5.3 Humane Antikörper und ImmunRNasen zur Behandlung von CD30⁺ Lymphomen

Der Antikörper SH313-B5 wurde über unterschiedliche Peptidlinker an die humanen RNasen 1-8 fusioniert und diese ImmunRNasen in Säugerzellen produziert. Neben einem flexiblen Glycin-Serin-Linker wurde ein intrazellulär spaltbarer dreiteiliger Adapter Ad_{emc} eingesetzt. Dieser Adapter Ad_{emc} besteht aus einer endosomalen Schnittstelle (e), die die *Pseudomonas* Exotoxin- und eine modifizierte Diphtherietoxin-Schnittstelle (RHRQPRGN-RVGRS) beinhaltet, einem Membrantransferpeptid (m) aus der PreS2-Domäne des Hepatitis B Virus Oberflächenantigens (PLSSIFSRIGDP) und einer zytosolischen Schnittstelle (c), die Caspase-Schnittstellen und eine Schnittstelle für zytosolische Proteasen aus Hefe (YVHDEVDRGP) enthält. Der Adapter sollte in den Endosomen die Abtrennung der RNase von dem hFc-Teil und deren Translokation in das Zytoplasma gewährleisten, wo die Abspaltung des restlichen Adapters erfolgen sollte [92, 93, 131].

Nach der Produktion und Reinigung mittels Protein A Affinitätschromatographie von ImmunRNasen mit dem Adapter Ad_{emc} wurde mittels SDS-PAGE eine starke Instabilität des Adapters detektiert (nicht gezeigt), die bereits von Hetzel *et al.* nachgewiesen wurde [92]. Aus diesem Grund wurde eine verkürzte Variante des Adapters eingesetzt, dem die endosomale Schnittstelle (e) fehlt. Für diesen Adapter Ad_{mc} wurde bei nahezu gleicher Effektivität eine deutlich höhere Stabilität gegenüber dem dreiteiligen Adapter Ad_{emc} nachgewiesen [92]. Die ImmunRNasen wurden mit diesem Adapter Ad_{mc} sowie dem Glycin-Serin-Linker produziert. Sie ließen sich unabhängig von dem eingesetzten Adapter bzw. Linker je nach fusionierter RNase 1-8 mit unterschiedlichen Ausbeuten von ~12-90 mg/mL in HEK293 6E Zellen produzieren und mittels Protein A Affinitätschromatographie reinigen. Für die ImmunRNasen mit den RNasen 3 und 7 wurden besonders niedrige Ausbeuten erhalten. Der Grund dafür könnte sowohl eine schlechte Produktions- und Sekretionsrate als auch eine Aggregation dieser Konstrukte sein [109, 130]. Für keine ImmunRNase mit diesen beiden Peptidlinkern wurde eine Instabilität festgestellt, was für einen möglichen Einsatz als Therapeutikum neben hohe Ausbeuten und effektiven Reinigungen ein wichtiges Kriterium ist [122, 124, 129, 130].

Nach der Produktion wurden die ImmunRNasen zunächst im Hinblick auf die Ausbildung von Multimeren und Aggregaten sowie das Vorhandensein von Glykosylierungen untersucht, da dadurch die Eigenschaften der Konstrukte beeinflusst werden können [130]. Durch die Behandlung der ImmunRNasen unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen und die präparative Größenausschlusschromatographie wurde deutlich, dass einige ImmunRNasen stärker bzw. heterogener glykosyliert waren als andere und unterschiedliche

Neigungen zur Multimer- bzw. Aggregatbildung aufwiesen. Der verwendete scFv-Fc Antikörper SH313-B5 wies in der SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen eine Größe auf, die weit über dem erwarteten Molekulargewicht des Proteins lag. Dieses anormale Laufverhalten in der SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen wird bei Fc-Fusionsproteinen und kompletten IgG Antikörpern häufig beobachtet und ist auf ein Disulfidbrücken-stabilisiertes Homodimer zurückzuführen [132]. Da dieser Antikörper in allen ImmunRNasen gleich war, konnten Unterschiede in deren Laufverhalten nur von der jeweiligen fusionierten RNase bedingt sein. Für die RNasen 4, 5 und 8 sind keine Glykosylierungen bzw. potentiellen Glykosylierungsstellen nachgewiesen worden [29], während die anderen RNasen 1, 2, 3, 6 und 7 als glykosylierte Proteine beschrieben wurden [29, 30]. In der SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen wurden die starken und heterogenen Glykosylierungen einiger ImmunRNasen sehr deutlich. Vor allem für die ImmunRNasen mit den RNasen 1, 2 und 3 sowie 6 wurden breit verschmierte Banden detektiert, die weit oberhalb der erwarteten molekularen Massen der ImmunRNasen lagen. Für die ImmunRNase mit RNase7 wurde eine breite Bande in der erwarteten Höhe detektiert, die auf schwache, aber heterogene Glykosylierungen schließen ließ. Die ImmunRNasen mit den RNasen 4, 5 und 8 hingegen bildeten scharfe Banden in der erwarteten Höhe aus, so dass Glykosylierungen nahezu ausgeschlossen werden konnten.

Bei der Untersuchung der Multimer- bzw. Aggregatbildung der ImmunRNasen wurde deutlich, dass die ImmunRNasen mit RNase3 eine Neigung zur Aggregatbildung aufwiesen. Da diese Eigenschaft zum Präzipitieren des Proteins führen kann, wäre das eine mögliche Erklärung für die niedrigen Ausbeuten bei der Produktion der ImmunRNasen mit RNase3. Für die anderen untersuchten ImmunRNasen mit den RNasen 1, 2, 4, 5, 6, 7 und 8 sowie den unfusionierten Antikörper SH313-B5-hFc wurde in erster Linie die Ausbildung von Dimeren und bei einigen eine schwache Tendenz zur Ausbildung von Tetrameren nachgewiesen, während Aggregate gar nicht oder nur in vernachlässigbaren Mengen detektiert wurden. Weiterhin wurde für die ImmunRNasen mit RNase7 die Abspaltung der RNase7 festgestellt. Die Vollständigkeit der ImmunRNasen ist für den therapeutischen Einsatz von großer Bedeutung, da bei einer Abspaltung der RNase vom Antikörper keine Internalisierung dieser als Effektordomäne in die Zielzellen mehr stattfindet.

Um einen Einfluss der Fusion des Antikörpers auf die Aktivität der RNasen und Inhibition dieser durch den RI zu untersuchen, wurden die Aktivitäten und Substratpräferenzen sowie die Inhibition der ImmunRNasen bestimmt und mit den Ergebnissen der freien RNasen 1, 4, 5 und 7 (siehe Kapitel 5.1) verglichen.

Die Enzymeffizienzen k_{cat}/K_M der ImmunRNasen variierten je nach fusionierter RNase 1-8 zwischen $\sim 2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $\sim 3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Die höchste ribonukleolytische Aktivität wurde für

die ImmunRNase mit RNase1 nachgewiesen, während mit RNase2 ein nur minimal niedrigerer Wert gemessen wurde. Dieses Ergebnis wurde auch für Hefe-tRNA als Substrat beschrieben [5]. Die Aktivität der RNase3 soll um zwei Potenzen niedriger sein als die der RNase2 [5]. Auch dieses Ergebnis konnte in dieser Arbeit verifiziert werden, da für die ImmunRNase mit RNase2 $\sim 1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und mit RNase3 $\sim 5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ermittelt wurden. Für die ImmunRNase mit RNase4 wurden in dieser Arbeit Werte von $\sim 5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (C) bzw. $\sim 7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (U) erhalten. Diese Enzymeffizienzen entsprachen recht genau dem Wert von $\sim 3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, der für ein anderes Uridin-haltiges Substrat ermittelt wurde [28]. Für die RNase6 wurde eine 40-fach geringere Aktivität als für RNase2 beschrieben [5], was in dieser Arbeit ebenfalls bestätigt werden konnte. Die Enzymeffizienz der ImmunRNase mit RNase6 war mit $\sim 4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ca. 30-fach geringer als die der ImmunRNase mit RNase2. Für die ImmunRNase mit RNase7 konnte in dieser Arbeit für das Cytidin-haltige Substrat eine ~ 20 -fach geringere Enzymeffizienz als für die ImmunRNase mit RNase1 ermittelt werden, während in anderen Arbeiten mit Hefe-tRNA als Substrat nur eine 8-fach schwächere Aktivität nachgewiesen wurde [5]. Die schwächsten Aktivitäten wiesen die ImmunRNasen mit den RNasen 5 und 8 auf, was den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen entspricht [5, 25, 26]. Insgesamt konnten früher publizierte Aktivitäten der RNasen 1-8 trotz anderer eingesetzter Substrate und meist bakteriell hergestellter RNasen auch für die ImmunRNasen sehr exakt nachvollzogen werden, so dass von einer funktionalen Faltung der RNasen ausgegangen werden konnte.

Eine eindeutige Substratpräferenz konnte lediglich für die ImmunRNase mit RNase7 nachgewiesen werden. Sie wies mit $1,6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ eine 4-fach höhere Aktivität gegenüber dem Cytidin-haltigen Substrat auf. Diese Aktivität und Präferenz entsprachen genau den zuvor ermittelten Daten der freien RNase7. Für die freien RNasen 4 und 5 konnten Präferenzen für das Uridin-haltige Substrat ermittelt werden (siehe Kapitel 5.1), die sich auch bei den entsprechenden ImmunRNasen finden ließen, aber weniger deutlich ausgeprägt waren.

Die ermittelten Enzymeffizienzen einiger ImmunRNasen waren niedriger als die der entsprechenden freien RNasen. Für eine ImmunRNase aus EDN (RNase2) und einem scFv-Fragment ist ebenfalls beschrieben worden, dass das Fusionsprotein im Vergleich zur unfusionierten RNase nur 6-13 % der ribonukleolytischen Aktivität aufwies [133]. Die verringerten Enzymeffizienzen könnten dadurch bedingt sein, dass die größeren ImmunRNasen im Vergleich zu den kleineren freien RNasen eine verlangsamte Diffusion in Flüssigkeiten aufweisen [134] und daher verzögert mit dem umzusetzenden Substrat in Berührung kommen. Ein Effekt durch die aminoterminalen Fusion des Antikörpers an die RNasen ist ebenfalls denkbar. Der N-Terminus der RNasen hat einen entscheidenden Einfluss auf die katalytische Aktivität, die Bindung durch den RI sowie die Zytotoxizität der RNasen [104].

Somit kann die Fusion eines Antikörpers an eine RNase wegen einer strukturellen Veränderung des Aktiven Zentrums der RNase sowohl die Umsetzung eines Substrates als auch die Substratpräferenzen beeinflussen [14, 28, 104].

Die Hemmung der ribonukleolytischen Aktivität der ImmunRNasen durch den RI war je nach RNase sehr unterschiedlich. Während die Aktivität der ImmunRNase mit RNase1 unabhängig von der Menge an eingesetztem RI nur auf ~80-90 % reduziert wurde, konnte für die ImmunRNasen mit den RNasen 2, 3, 6 und 7 eine eindeutige, aber keine vollständige Hemmung der Aktivität nachgewiesen werden. Die Aktivitäten der ImmunRNasen mit den RNasen 4, 5 und 8 hingegen wurden vollständig gehemmt, wobei bei den RNasen 5 und 8 bereits eine äquimolare Menge an RI für eine komplette Inhibition ausreichte. Für die RNase5 ist bereits eine der stärksten Hemmungen innerhalb der Proteinfamilie beschrieben worden [5, 24, 28]. Die Ausprägung der Inhibition der ImmunRNasen mit den RNasen 1, 4, 5 und 7 durch den RI war vergleichbar mit der Hemmung der entsprechenden freien RNasen. Dies spricht gegen einen Einfluss der aminoterminalen Fusion des Antikörpers auf die Inhibition durch den RI, obwohl beschrieben ist, dass die Ausbildung des RNase-RI-Komplexes durch die Fusion einer weiteren Proteindomäne verändert werden kann [104, 119]. Wie bereits in Kapitel 5.1 erläutert, kann die unterschiedliche Hemmung mit der Glykosylierung der RNasen zusammenhängen. Dafür spräche, dass die RNasen 4, 5 und 8 der vollständig inhibierten ImmunRNasen als unglykosylierte Proteine beschrieben sind, während die ImmunRNasen mit den glykosylierten RNasen 1, 2, 3, 6 und 7 [5, 29, 30] unvollständig durch den RI gehemmt wurden. Starke und heterogene Glykosylierungen scheinen demnach die Bindung durch den RI abzuschwächen oder gar zu verhindern, während unglykosylierte Proteine vollständig gehemmt werden. Weiterhin kann es durch die beiden RNasen in der dimeren Struktur der ImmunRNasen zu sterischen Behinderungen kommen, die eine Bindung beider RNasen durch den großen RI verhindern. Natürlich vorkommende dimere RNasen wie die bovine seminale RNase (BS-RNase) sind gegenüber dem RI unempfindlich, weil durch die Dimerbildung eine sterische Behinderung der RI-Bindung vorliegen kann [34, 119]. Die BS-RNase weist eine Mischung zweier Quartärstrukturen MxM bzw. M=M auf, wobei offensichtlich nur die MxM-Variante zytotoxisch wirkt [135].

Die Spezifität der ImmunRNasen für natives CD30 auf Lymphomzellen und ein möglicher Einfluss der verwendeten humanen RNasen 1-8 auf die Zellbindung wurden mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die spezifische Bindung des CD30-spezifischen Antikörpers SH313-B5-hFc und der ImmunRNasen SH313-B5-hFc-Ad_{mc}-RN1-8 an die CD30⁺ Karpas299 Zellen wurde nachgewiesen, wobei die mittleren Fluoreszenzintensitäten des unfusionierten

Antikörpers und der ImmunRNasen in der gleichen Größenordnung lagen. Es wurde keine Bindung dieser Konstrukte an die CD30⁻ Jurkat Zellen detektiert. Für den Kontrollantikörper MS112-IIB1-hFc wurde keine Bindung an die CD30⁺ Karpas299 Zellen detektiert, aber für die auf diesem Antikörper basierenden Kontroll-ImmunRNasen MS112-IIB1-hFc-Ad_{mc}-RN3 und -RN4 wurde interessanterweise eine stärkere Zellbindung als für den unfusionierten Antikörper nachgewiesen. Da kein Rezeptor für RNasen auf Zelloberflächen beschrieben ist [121], handelte es sich wahrscheinlich um eine unspezifische Bindung. Diese könnte zum Einen durch die Ladung oder Ladungsverteilung wie auch die Struktur und Glykosylierung der ImmunRNasen bedingt sein [121, 136].

Die Nettoladungen der eingesetzten humanen RNasen 1-8 lagen im positiven Bereich. Die RNasen 1, 2, 4, 6 und 8 haben einen pI-Wert nahe 9 und die RNasen 5 und 7 nahe 10, während die RNase3 sogar einen pI-Wert von fast 11 aufweist [31]. Die hohe positive Nettoladung der RNasen kann die Anlagerung der ImmunRNasen an Zelloberflächen sowie den zytosolischen Eintritt begünstigen [121], die aufgrund der Phospholipide und der Vielzahl an Glykoproteinen negativ geladen sind [40]. Die verstärkte Bindung der ImmunRNasen mit den RNasen 3 und 4 konnte aber nicht allein durch deren pI-Werte erklärt werden, weil es keine Korrelation der pI-Werte der untersuchten RNasen 1-8 und der Bindungsstärke der ImmunRNasen an die Zellen gab. Demnach könnte die Ladungsverteilung innerhalb der RNase oder der ImmunRNase entscheidend sein. Es ist beschrieben, dass neben der Gesamtladung vor allem die Ladungsverteilung im Protein einen entscheidenden Einfluss auf die Bindung an Zellen hat [121].

Eine Neigung zur Aggregatbildung und Glykosylierungen der ImmunRNasen können ebenfalls einen verstärkenden Effekt auf die Zellbindung haben. Für die ImmunRNasen mit RNase3 ist die Bildung von Proteinaggregaten nachgewiesen worden, die durch die Valenzeffekte eine stärkere Zellbindung vermitteln könnten. Weiterhin waren diese ImmunRNasen stark und heterogen glykosyliert. Die ImmunRNasen mit RNase4 lagen hingegen wie die übrigen ImmunRNasen in erster Linie als Dimere vor und waren nicht glykosyliert [5, 14, 29], so dass ein derartiger Effekt ausgeschlossen werden konnte.

Ein Einfluss der Ladung und Glykosylierung der Zelloberfläche auf die Bindung von Proteinen kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Die Zusammensetzung der Oberfläche von Tumorzellen ist im Vergleich zu gesunden Zellen anders und könnte eine selektive Bindung von RNasen begünstigen. Die Zelloberflächen sind anders glykosyliert und haben eine andere Phospholipid- und Gangliosidzusammensetzung [121, 136]. Weiterhin haben Membranen maligner Zellen verglichen mit denen von gesunden Zellen einen höheren Gehalt an negativen Ladungen. Die hohe elektrostatische Anziehung zwischen RNasen und negativ geladenen Membranen beeinflusst die Membranaggregation, -fluidität

und -verschmelzung. Die RNasen können durch die Wechselwirkung eine Destabilisierung der Membranen bewirken, die mit ihrer Zytotoxizität korreliert [136].

Durch die Bindung des CD30-spezifischen Antikörpers SH313-B5-hFc und der ImmunRNasen an das native Antigen CD30 kann das Ablösen des CD30 von der Zelloberfläche durch eine proteolytische Spaltung entweder gefördert oder verhindert werden [137]. Bei der ALCL Zelllinie Karpas299 wird die Abspaltung der extrazellulären Domäne des CD30 durch die meisten Antikörper gefördert, während es die beiden Antikörper Ber-H2 und Ki-4 verhindern. Dieser Effekt hängt von dem erkannten Epitop des Liganden bzw. Antikörpers ab. Der Antikörper Ber-H2 erkennt wie der in dieser Arbeit eingesetzte SH313-B5 ein lineares Epitop [138]. Wenn das Antigen CD30 von der Oberfläche der Zellen durch dieses sogenannte *Shedding* entfernt würde, könnten keine weiteren Antikörper oder ImmunRNasen an die Zellen binden und ihre Wirkung ausüben. Das *Shedding* durch die CD30-spezifischen Antikörper oder ImmunRNasen wäre also ein nachteiliger Effekt, wurde in dieser Arbeit aber nicht untersucht.

Neben dem *Shedding* kann die Bindung an CD30 auf Zelloberflächen auch intrazelluläre Prozesse auslösen [137], die die Viabilität bzw. das Wachstum der Zellen beeinflussen können [99, 139, 140]. Die Wirkung des CD30-spezifischen Antikörpers SH313-B5-hFc und der ImmunRNasen auf die Viabilität bzw. das Wachstum von CD30⁺ Lymphomzellen wurde mittels MTT-Test untersucht. Es wurden zunächst nur die ImmunRNasen mit dem spaltbaren Adapter Ad_{mc} eingesetzt, da aufgrund der Ergebnisse von Hetzel *et al.* von einem stärkeren Effekt dieser ImmunRNasen verglichen mit den ImmunRNasen ohne Adapter ausgegangen wurde [92]. Der Adapter sollte nach der Internalisierung der Konstrukte durch sein Membrantransferpeptid eine effektivere Translokation aus den Endosomen in das Zytoplasma gewährleisten und dadurch eine erhöhte Zytotoxizität der RNasen bewirken [136]. Anschließend sollten die RNasen über die zytosolische Schnittstelle von dem dimeren Fc-Teil abgetrennt werden, so dass sie frei vorlagen und wegen des fehlenden Membrantransferpeptids die Zelle nicht mehr verlassen konnten [141].

Für den CD30-spezifischen Antikörper SH313-B5-hFc wurde ein starker Effekt auf die Viabilität bzw. das Wachstum der CD30⁺ Lymphomzellen mit einem IC₅₀-Wert von ~200 nM (~22 µg/mL) nachgewiesen. Für keine der untersuchten CD30-spezifischen ImmunRNasen mit dem spaltbaren Adapter wurde jedoch eine Verstärkung dieses Effektes detektiert. Für die ImmunRNase mit RNase3 wurde eine vergleichbar starke Wirkung nachgewiesen, während die anderen ImmunRNasen einen geringeren Effekt auf die Viabilität bzw. das Wachstum der Zellen aufwiesen. Für keines der untersuchten Proteine wurde ein Effekt auf die CD30⁻ Jurkat Zellen detektiert. Der nicht-CD30-spezifische Kontrollantikörper MS112-IIB1-hFc und die ImmunRNasen mit diesem Antikörper wiesen mit Ausnahme des

Konstruktes mit RNase3 keinen Effekt auf die CD30⁺ Karpas299 Zellen auf. Dieses Konstrukt bewirkte aber nur bei der höchsten eingesetzten Konzentration von $3 \cdot 10^{-7}$ M eine Reduktion der Zellzahl, was möglicherweise auf eine unspezifische Zellbindung bei höheren Konzentrationen zurückgeführt werden kann.

Die Ergebnisse für die CD30-spezifischen ImmunRNasen entsprachen nicht den Erwartungen, weil in der Literatur eine erhebliche Verstärkung der Zytotoxizität von Immunotoxinen und ImmunRNasen durch den eingesetzten spaltbaren Adapter Ad_{mc} beschrieben wurde [92]. Vor der Analyse der ImmunRNasen mit dem flexiblen Glycin-Serin-Linker wurden zunächst einmal weitere Untersuchungen zu der Stabilität und dem Wirkmechanismus der ImmunRNasen durchgeführt.

Die Stabilität und erfolgreiche Translokation der ImmunRNasen mit spaltbarem Adapter sowie dessen Spaltung hängen sowohl von der Zusammensetzung des Adapters als auch von den fusionierten Proteinen ab. Für den Adapter Ad_{mc} wurde die Stabilität und erfolgreiche Spaltung bereits in anderen Arbeiten nachgewiesen [92, 93]. Dennoch wurde die Stabilität einiger ImmunRNasen mit dem Adapter im Vergleich zu denjenigen mit dem Glycin-Serin-Linker erneut untersucht. Dafür wurden die Bedingungen der MTT-Tests gewählt und die Stabilität der ImmunRNasen über einen Zeitraum von 72 h bei 37 °C analysiert. Die ImmunRNasen mit den RNasen 3, 6 und 8 wurden untersucht, da für diese im MTT-Test die stärksten Effekte ermittelt wurden. Die ImmunRNase mit RNase7 wurde wegen ihrer bereits nachgewiesenen Instabilität nicht untersucht. Für die untersuchten ImmunRNasen konnte über den Zeitraum von 72 h bei 37 °C eine extrazelluläre Degradation ausgeschlossen und damit die Stabilität des Adapters Ad_{mc} bewiesen werden.

Die intrazelluläre Abspaltung der RNasen vom Antikörper würde die Bindung durch den RI begünstigen und könnte der Grund für die geringe Effektivität der ImmunRNasen mit dem spaltbaren Adapter sein. Dieser Nachteil ließe sich aber durch eine verbesserte Internalisierungs- und Translokationsrate ausgleichen. Würde die RNasekonzentration im Zytoplasma die des RI übersteigen, wäre eine Neutralisation des RI möglich, wie De Lorenzo *et al.* für ihre RI-empfindliche ImmunRNase bereits nachweisen konnten [142].

Die intrazelluläre Spaltung der ImmunRNasen setzt eine Caspase-Aktivität voraus, da die zytosolische Schnittstelle des Adapters u.a. aus einer Caspase-3- (YVHD) und einer Caspase-7- (DEV D) Erkennungssequenz besteht [141]. Da die Expression von Caspasen von Zellen erst bei Apoptoseprozessen induziert wird [141], wurde untersucht, ob der CD30-spezifische Antikörper bzw. die ImmunRNasen Apoptose bei den Lymphomzellen auslösen. Statt Apoptose könnten die Konstrukte auch eine Proliferationsinhibition bewirken [69, 71, 99, 137]. Auch für eine potentielle Therapie von CD30⁺ Lymphomerkkrankungen mit dem Antikörper oder den ImmunRNasen ist deren Wirkmechanismus entscheidend. Würden sie

Apoptose bei den Zellen auslösen, wären sie als Begleittherapie bei einer Chemotherapie denkbar [74]. Neben dem Antikörper SH313-B5-hFc wurden die ImmunRNasen mit den RNasen 3, 6 und 8 untersucht, da für diese im MTT-Test die stärksten Effekte und die Stabilität bei 37 °C nachgewiesen wurden.

Für den Antikörper SH313-B5-hFc und die ImmunRNasen wurde eine starke Reduktion der Zellzahl der CD30⁺ Karpas299 Zellen durch Trypanblaufärbung und Bestimmung der Zellzahl nach 72 h nachgewiesen. Auch die Kontroll-ImmunRNase mit RNase3 wies einen Effekt auf, während die anderen Kontrollkonstrukte keine signifikante Reduktion der Zellzahl bewirkten. Es wurde auch kein signifikanter Einfluss auf die CD30⁻ Jurkat Zellen detektiert. Die Ergebnisse waren aufgrund der höheren eingesetzten Konzentration von $5 \cdot 10^{-7}$ M deutlicher ausgeprägt als die Ergebnisse des vorangegangenen MTT-Tests. Für alle ImmunRNasen und Kontrollen lag der Anteil der toten Zellen bei nur 1-2 %, was auf einen nicht-apoptotischen Wirkmechanismus hindeutet. Hübinger *et al.* und Fouladi konnten mittels Trypanblaufärbung ebenfalls keine gesteigerte Zahl an toten Karpas299 Zellen nach Aktivierung des CD30 detektieren, obwohl die Zellzahl gegenüber unbehandelten Zellen stark verringert war [73, 74]. Horie *et al.* untersuchten mehrere ALCL-Zelllinien nach der Stimulation von CD30 und wiesen ebenfalls eine Reduzierung der Zellzahl nach, die wegen der fehlenden DNA-Fragmentierung nicht auf Apoptose hinwies [71].

Es ist beschrieben, dass die Bindung von Antikörpern oder ImmunRNasen an CD30 je nach Zelllinie Differenzierung, Aktivierung, (Anti-)Proliferation oder Apoptose auslösen kann [69, 71, 99, 137]. Der Mechanismus bei der Bindung an CD30 umfasst die Trimerisierung und Aktivierung des Rezeptors und dadurch ausgelöste Signalwege in der Zelle, die zu diesen pleiotropen Effekten führen [99, 139, 140]. Nach der Aktivierung des CD30 erfolgt die Interaktion des zytoplasmatischen Teils mit den TNFR-assoziierten Proteinen 1, 2 und 3 (TRAF1, 2 und 3). Die dadurch ausgelöste Signaltransduktion aktiviert NF- κ B [71, 73, 140], was auch für die Zelllinie Karpas299 nachgewiesen wurde [73]. Je nach Zelltyp und den Signalen aus der Zellumgebung können dann die Zellproliferation gefördert [71, 74, 143, 144] oder auch antiproliferatorische Effekte oder gar Apoptose ausgelöst werden [71, 74, 99]. Apoptose wird bei CD30 aber nicht wie bei anderen Mitgliedern der TNF-Familie durch eine sogenannte Todesdomäne (engl. *death domain*) initiiert [73, 74, 144].

Da für die Karpas299 Zellen trotz stark reduzierter Zellzahl keine Apoptose nachgewiesen wurde, fand vermutlich eine Proliferationsinhibition statt. Da die für die Spaltung des Adapters Ad_{mc} nötigen Caspasen erst bei apoptotischen Prozessen exprimiert werden, war die Spaltung unwahrscheinlich. Für einen Einsatz des Antikörpers oder der ImmunRNasen als begleitende Therapie von CD30⁺ Lymphomen ist eine Proliferationsinhibition kontraindiziert, da eine Chemotherapie nur die proliferierenden Zellen erfasst [74]. Allerdings kann der hier beobachtete Effekt für die ALCL-Zelllinie Karpas299 nicht auf alle CD30⁺ Zelllinien

übertragen werden, da antagonistische Effekte bei der Stimulation von CD30 bei unterschiedlichen Zelllinien bekannt sind [69, 71, 99, 137].

Auffällig war, dass nach der Inkubation der Zellen mit dem CD30-spezifischen Antikörper und den ImmunRNasen mittels Mikroskop eine veränderte Verteilung der Zellen in den *wells* zu beobachten war. Neben der reduzierten Zellzahl waren deutliche Clusterbildungen nachzuweisen, die bei den Kontrollen nicht beobachtet werden konnten (nicht gezeigt). Die Ausbildung derartiger Zellcluster in Zellkulturen kann durch die Expression von interzellulären Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 (engl. *intercellular adhesion molecule-1*) ausgelöst werden [73]. Das glykosylierte Oberflächenprotein ICAM-1 ist für die Ausbildung von Zell-Zell-Interaktionen verantwortlich. Seine Überexpression nach der Aktivierung von CD30 wäre denkbar, da die Expression durch NF- κ B reguliert wird. Dafür spräche, dass die Clusterbildung nach CD30-Stimulation in anderen Arbeiten durch ICAM-1-spezifische Antikörper verhindert werden konnte [73].

Die rezeptorvermittelte Endozytose von anderen CD30-spezifischen Antikörpern in CD30⁺ Zellen ist bereits nachgewiesen worden [76] und sollte für den Antikörper SH313-B5-hFc und die ImmunRNasen zusammen mit deren Translokation in das Zytoplasma gezeigt werden. Es wurde für alle untersuchten CD30-spezifischen ImmunRNasen sowie den Antikörper SH313-B5-hFc eine Internalisierung nachgewiesen, die durch eine zeitliche Zunahme der roten Fluoreszenz innerhalb der ersten 7 h mittels durchflusszytometrischer Analyse belegt wurde. Die mikroskopischen Aufnahmen bestätigten die rezeptorvermittelte Endozytose, die zur Akkumulation der Rezeptor-Liganden-Komplexe in Vesikeln im Zytoplasma führte. Diese intrazelluläre Verteilung ist typisch für eine rezeptorvermittelte Endozytose von Liganden [145]. Das Antigen CD30 gehört zu der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor- (TNFR-) Superfamilie [69]. Für den Tumornekrosefaktor (TNF) wurde nachgewiesen, dass nach der Bindung die Rezeptormultimerisierung innerhalb von 10 min stattfand und nach 30 min eine vesikuläre Färbung in größeren intrazellulären Kompartments detektierbar war, was auf eine Akkumulation in späten Endosomen hinweist. Nach 60 min konnte eine Färbung rund um den Zellkern erfasst werden, die auf eine lysosomale Lokalisation hindeutet. Für den TNF wurde demnach innerhalb von einer Stunde eine Aufnahme in die Zellen und der Transport in die Lysosomen nachgewiesen [146]. Dieser Ablauf der rezeptorvermittelten Endozytose ist für CD30 ebenfalls denkbar.

Die Freisetzung des Antikörpers und der ImmunRNasen aus den Vesikeln in das Zytoplasma konnte nicht direkt nachgewiesen werden. Die durchflusszytometrische Messung mit den markierten Konstrukten ist über einen Zeitraum von 24 h erfolgt, so dass ein zeitlicher Verlauf der roten Fluoreszenz erfasst werden konnte. Diese Fluoreszenz nahm ab einem Zeitpunkt von 7 h für alle internalisierten Konstrukte wieder ab. Dies könnte ein Hinweis auf

eine Freisetzung der ImmunRNasen sein, da im Zytoplasma aufgrund des neutralen pH-Wertes keine Fluoreszenz mehr nachzuweisen wäre. Das Nachlassen der roten Fluoreszenz könnte aber auch durch die Degradation der Konstrukte begründet sein. Weiterhin könnte sie durch die Proliferation der Zellen ausgelöst worden sein, da sich die Vesikel auf die Tochterzellen verteilen und damit den aufgenommenen Farbstoff verdünnen. Da die Karpas299 Zellen einen extrem geringen Anteil an Zytoplasma und einen oder mehrere riesige Kerne aufweisen, war die bildliche Darstellung der Freisetzung der ImmunRNasen in das Zytoplasma nicht möglich.

Die durch Ligandenbindung stimulierte rezeptorvermittelte Endozytose bewirkt eine Verringerung der Rezeptorkonzentration auf der Zelloberfläche, die entweder durch Neusynthese oder Recycling endozytierter Rezeptoren zur Zellmembran ausgeglichen wird. Auch TNF-Rezeptoren wie CD30 können zwischen dem Zellinneren und der Zellmembran zirkulieren [147] und regulieren auf diese Weise ihre Konzentration auf der Zelloberfläche [148]. Mit einer durchflusszytometrischen Analyse wurde nachgewiesen, dass die Menge an CD30 in der Karpas299-Kultur während der Internalisierung des Antikörpers SH313-B5-hFc innerhalb von 4 h stetig geringer wurde (Daten im Anhang A.2).

Da die ImmunRNasen mit dem spaltbaren Adapter entgegen den Erwartungen keine stärkere Proliferationsinhibition der CD30⁺ Karpas299 Zellen als der Antikörper SH313-B5-hFc bewirkten, wurden die ImmunRNasen mit dem flexiblen Glycin-Serin-Linker mittels MTT-Test analysiert. Für den CD30-spezifischen Antikörper SH313-B5-hFc konnte erneut die starke Proliferationsinhibition der CD30⁺ Lymphomzellen mit einem IC₅₀-Wert von ~100 nM (~11 µg/mL) nachgewiesen werden. Die CD30-spezifischen ImmunRNasen mit den RNasen 3, 4, 5, 6 und 7 bewirkten noch massivere Effekte mit einer bis zu 100-fach stärkeren Proliferationsinhibition als der Antikörper.

Der Glycin-Serin-Linker sollte eine hohe Beweglichkeit der beiden RNasen an den ImmunRNasen und eine stabile Dimerisierung gewährleisten. Durch die dimere Struktur könnte eine Inhibition der Aktivität beider RNasen durch den zytosolischen RI aufgrund von sterischen Behinderungen umgangen werden [119]. Dimere ImmunRNasen wiesen bereits in anderen Arbeiten höhere Zytotoxizitäten gegenüber Tumorzellen auf als ihre monomeren Formen [149]. Natürlich vorkommende dimere RNasen wie die BS-RNase weisen ebenfalls eine Unempfindlichkeit gegenüber dem RI auf und sind daher zytotoxisch [136], während ihre monomeren Formen durch den RI gehemmt werden [34].

Die ImmunRNase SH313-B5-hFc-RN3 wies die stärksten Effekte mit einem IC₅₀-Wert von ~1 nM (~140 ng/mL) auf. Dies war eine 100-fach stärkere proliferationsinhibitorische Wirkung als die des unfusionierten Antikörpers. Für eine ImmunRNase aus EDN (RNase2) und einem Transferrin-Rezeptor-spezifischen scFv-Fragment wurden IC₅₀-Werte von 0,2-1 nM ermittelt,

während für die RNase2 allein keine zytotoxische Wirkung nachgewiesen wurde [133]. Für weitere Immuntoxine mit verschiedenen CD30-spezifischen Antikörpern (Fv) und einer Mutante des *Pseudomonas* Exotoxin wurden in Abhängigkeit der CD30⁺ Lymphomzelllinie Werte von 0,3-100 ng/mL erhalten [125]. Andere ImmunRNasen wie ein CD22-spezifischer bakteriell hergestellter Diabody mit zwei Onconasevarianten ergaben IC₅₀-Werte von 3-20 nM [149]. Der für die ImmunRNase SH313-B5-hFc-RN3 ermittelte IC₅₀-Wert lag in der gleichen Größenordnung wie die Werte anderer Immuntoxine. Wegen der Neigung zur Aggregatbildung und der starken Glykosylierung dieser ImmunRNase konnte von einer verstärkten Zellbindung und dadurch erhöhten Internalisierungsrate ausgegangen werden. Für viele ImmunRNasen mit dem CD30-Liganden, einem CD30-spezifischen Antikörper, Wachstumsfaktoren oder Transferrin wurde bereits aufgrund einer erhöhten Internalisierungsrate eine verstärkte Zytotoxizität im Vergleich zu den unfusionierten Komponenten nachgewiesen [92, 118, 119, 121, 133]. Weiterhin ist für die RNase3 als besondere Eigenschaft beschrieben worden, dass sie Zellmembranen durch Porenbildung destabilisieren kann und dadurch eine hohe zytotoxische Wirkung hat [22, 23].

5.4 Fazit

Der für die ImmunRNasen ausgewählte CD30-spezifische Antikörper SH313-B5-hFc weist bereits ohne Fusion einer RNase als Effektordomäne vielversprechende Eigenschaften im Hinblick auf die Bekämpfung von CD30⁺ Lymphomen auf, da die spezifische Bindung an CD30 auf Tumorzellen bei der ALCL-Zelllinie Karpas299 zu einer halbmaximalen Inhibition der Zellproliferation bei einer Konzentration von ~100 nM führte. Für die untersuchten ImmunRNasen mit dem spaltbaren Adapter konnte entgegen den Erwartungen keine Verstärkung dieses Effektes nachgewiesen werden. Der Großteil der CD30-spezifischen ImmunRNasen mit dem Glycin-Serin-Linker wies aber stärkere inhibitorische Effekte auf die Proliferation der CD30⁺ Zellen als der unfusionierte Antikörper auf. Für die ImmunRNase SH313-B5-hFc-RN3 mit dem flexiblen Glycin-Serin-Linker konnte eine enorme Verstärkung der proliferationsinhibierenden Wirkung auf die CD30⁺ Lymphomzellen nachgewiesen werden. Dies könnte durch die membrandestabilisierende Wirkung der RNase3 bedingt sein, die ihr ein hohes zytotoxisches Potential verleiht [22, 23]. Diese ImmunRNase wies allerdings die Neigung zur Aggregatbildung auf, was für einen therapeutischen Einsatz von Nachteil ist, da Proteinaggregate ein erhöhtes immunogenes Potential besitzen [130]. Diese Neigung zur Aggregatbildung und die starke Glykosylierung dieser ImmunRNase könnte aber zu einer verstärkten Zellbindung und dadurch erhöhten Internalisierungsrate geführt haben. Die Internalisierung der Rezeptor-Liganden-Komplexe in die CD30⁺ Zellen wurde nachgewiesen, aber die Freisetzung der Konstrukte in das Zytoplasma ist nicht gesichert. Die 100-fach stärkere proliferationsinhibitorische Wirkung der ImmunRNase SH313-B5-hFc-RN3 verglichen mit dem Antikörper SH313-B5-hFc könnte aber für eine erfolgreiche Translokation und einen dadurch bedingten zusätzlichen zytotoxischen Effekt auf die CD30⁺ Lymphomzellen sprechen.

6 Ausblick

Der Effekt des Antikörpers und der ImmunRNasen auf die CD30⁺ Karpas299 Zellen sollte weiter untersucht werden. Um Apoptose als Mechanismus sicher auszuschließen, könnte eine Untersuchung auf DNA-Fragmentierung durchgeführt werden [150]. Eine gleichzeitige Färbung der Zellen mit Annexin V und Propidiumiodid mit anschließender durchflusszytometrischer Analyse ermöglicht die Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose [150, 151]. Die alleinige Färbung der Zellen mit Propidiumiodid und durchflusszytometrische Untersuchung können einen Aufschluss über einen möglichen ausgelösten Zellzyklusarrest geben [152]. Weiterhin könnten Untersuchungen zum Recycling des CD30 sowie zum intrazellulären Transport der Konstrukte nach der Internalisierung durchgeführt werden.

Der Antikörper SH313-B5-hFc und die ImmunRNasen mit den humanen RNasen 1-8 sollten auf anderen CD30⁺ Zelllinien getestet werden, da bekannt ist, dass die Effekte bei der Aktivierung des CD30 je nach Zelllinie, Differenzierungsgrad und Stimuli aus der Zellumgebung unterschiedlich sein können. Zunächst sollten die Zelllinien mittels MTT-Test untersucht werden und im weiteren Verlauf wären auch *in vivo* Versuche denkbar. Es wäre möglich, dass der Antikörper oder die ImmunRNasen *in vivo* sehr gut funktionierten, da die Bedingungen *in vitro* und *in vivo* nicht vergleichbar sind.

Weiterhin sollte der Antikörper auf das Auslösen von CDC und ADCC untersucht werden. Bei der Therapie von Lymphomen wären diese Effekte weitere Möglichkeiten, die Tumorzellen zu zerstören.

Die Formate der ImmunRNasen könnten verändert werden. In dieser Arbeit ist lediglich das dimere Format scFv-Fc-RNase mit verschiedenen Linkern zwischen dem Antikörper und der RNase untersucht worden. Da die Fusion am N-Terminus der RNase stattfand und bekannt ist, dass der N-Terminus der RNase eine wichtige Rolle für die RNase-Aktivität spielt [104], sollte eine umgekehrte Orientierung versucht und die RNase an den N-Terminus des Antikörpers kloniert werden. Weiterhin könnten auch kleinere monomere Formate wie scFv-RNase oder andere dimere Formate sowie andere Linker untersucht werden.

Für die RNase5 ist beschrieben worden, dass sie über ein Kernlokalisierungssignal (NLS) in den Zellkern transportiert wird und so trotz ihrer Sensitivität für den RI diesem entkommen kann [118]. Die Fusion eines NLS wäre demnach ein weiterer interessanter Aspekt, der eine Degradation der mRNA bereits im Zellkern ermöglichen würde, wo die RNase vor dem RI geschützt ist.

7 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampicillin
Ad	Adapter
ADCC	<i>Antibody Dependend Cellular Cytotoxicity)</i>
ADEPT	<i>Antibody Dependend Enzyme Prodrug Therapy</i>
Ad _{mc}	Adapter mit Membranpermeabilitätsdomäne (m) und zytosolischer Schnittstelle (c)
AG	Arbeitsgruppe
AK oder Ak	Antikörper
ALCL	<i>Anaplastic Large Cell Lymphoma</i>
ANG	Angiogenin
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
AS	Aminosäure
ATL	Adultes T-Zell Lymphom
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
BHQ1	<i>Black Hole Quencher 1</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
BS-RNase	bovine seminale RNase
C	Cytidin
CD30ex	extrazellulärer Teil des Antigens CD30
CDC	<i>Complement Dependent Cytotoxicity</i>
CDR	<i>Complement Determing Region</i>
cfu	<i>Colony Forming Units</i>
C _H	<i>constant heavy</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CIP	<i>Calf Intestine Protease</i>
CM	Christian Menzel
CpA	Cytidylyl-3'-5'-Adenosin
C-Terminus	Carboxy-Terminus
D	Durchlauf
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
dsRNA	<i>Double-Stranded RNA</i>
EBV	Epstein Barr Virus
ECP	<i>Eosinophil cationic protein</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDN	<i>Eosinophil-Derived Neurotoxin</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EGF(R)	<i>Epidermal Growth Factor (Receptor)</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
engl.	englisch
f oder for	<i>forward</i>
Fab	<i>Fragment antigen binding</i>
FACS	Durchflusszytometrie (<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>)
FAM	Carboxyfluorescein
Fc	<i>Fragment crystallizable</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fv	<i>Fragment variable</i>
G	Glukose
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
Gly-Ser	Glycin-Serin
H	<i>Heavy</i>
HAL	<i>Human Antibody Library</i>
HEK	<i>Human Embryonal Kidney</i>
hFc	Humaner IgG1-Fc-Teil
His	Histidin
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HL	Hodgkin Lymphom
HRP	<i>Horse Radish Peroxidase</i>
H-RS	Hodgkin-Reed-Sternberg
HTLV-1	Humanes T-lymphotropes Virus 1
HZI	Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
IEC	<i>Ion Exchange Chromatography</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleucin
IMAC	<i>Immobilised Metal Ion Affinity Chromatography</i>
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranosid
IT	ImmunToxin
IWB	Immuno-Western-Blot
K	Kontrolle
k _{on}	Assoziationsrate
kb	Kilobasenpaare
k _{off}	Dissoziationsrate

k _D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
L	<i>light</i>
Lys	Lysin
M	Marker
M	Molar
M	Milchpulver
mFc	muriner IgG1-Fc-Teil
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MMAE	Monomethyl Auristatin E
MPI	Max-Planck-Institut
mRNA	messenger RNA
MS	Mark Schütte
MTP	Mikrotiterplatte
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MWCO	<i>Molecular Weight Cut Off</i>
n. b.	nicht bestimmt
NBT	Nitroblautetrazolium
Neg. oder N	Negativkontrolle
NF-κB	<i>Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer'</i> (Transkriptionsfaktor)
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NK	Natürliche Killerzelle
NLS	<i>Nuclear Localization Signal/Sequence</i>
N-Terminus	Amino-Terminus
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEI	Polyethylenimin
pelB	Signalpeptidsequenz zum Transport des Proteins in das Periplasma
pI	Isoelektrischer Punkt
PP	Polypropylen
PPP	periplasmatische Präparation
PS	Polystyrol
PVDF	Polyvinylidenfluorid
r oder rev	<i>reverse</i>
rC	Cytidin
RI	RNase-Inhibitor
RN	Ribonuklease, RNase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease

rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	Zellultumedium, am Roswell Park Memorial Institute entwickelt
RT	Raumtemperatur
rU	Uridin
RU	<i>Resonance Units</i>
sCD30	<i>soluble CD30</i>
scFv	<i>single chain Fragment variable</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
sek. Ak	Sekundärantikörper
Ser	Serin
SH	Saskia Helmsing
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolic repression</i>
spez.	spezifisch
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
ssRNA	<i>Single-Stranded RNA</i>
SV40	Simianes Virus 40
T	Tween
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
TEV _{cs}	<i>TEV cleavage site</i>
TM	Torsten Meyer
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF(R)	<i>Tumor Necrosis Factor (Receptor)</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	<i>transfer-RNA</i>
TS	Thomas Schirrmann
U	Uridin
U	<i>Unit</i>
ü.N.	über Nacht
UpA	Uridyl-3'-5'-Adenosin
UV	ultraviolett
(v/v)	Volumen pro Volumen
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
v _H	<i>variable heavy</i>
v _L	<i>variable light</i>
(w/v)	Gewicht pro Volumen
WHO	<i>World Health Organization</i>
wt	Wildtyp
XWe	Xenia Wezler

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Struktur von vier Mitgliedern der RNase A Superfamilie	2
Abbildung 1-2: Chromosomale Lokalisation der humanen RNase Gene	3
Abbildung 1-3: Phylogenetischer Baum der humanen RNasen 1-8	4
Abbildung 1-4: Aminosäure-Alignment der acht klassischen humanen RNasen	7
Abbildung 1-5: Struktur eines RI-RNase-Komplexes	8
Abbildung 1-6: Schematischer Aufbau eines Antikörpers (IgG-Isotyp)	10
Abbildung 1-7: Schematischer Aufbau einiger Antikörperformate	12
Abbildung 1-8: Übersicht über die Wirkmechanismen von Antikörpern in der Tumorthherapie	13
Abbildung 1-9: Schematischer Ablauf nach der Zellbindung einer ImmunRNase	20
Abbildung 1-10: Schematischer Aufbau des humanen Tumormarkers CD30	23
Abbildung 3-1: Chemische Struktur des Substrates 6-FAM-dArUdAdA-6-BHQ1	50
Abbildung 4-1: Übersicht über die verschiedenen Ansätze zur Produktion der RNasen 1-8	57
Abbildung 4-2: Analyse der produzierten RNase1 mittels SDS-PAGE und Immunfärbung	58
Abbildung 4-3: Analyse der RNasen 1-8 mittels SDS-PAGE	59
Abbildung 4-4: Proteolytische Spaltung der RNasen 1-8 vom hFc-Teil mittels TEV-Protease	60
Abbildung 4-5: Reinigung am Beispiel der RNase1	61
Abbildung 4-6: Aktivitätstest am Beispiel der RNase7	62
Abbildung 4-7: Inhibition der RNaseaktivität von RNase 1, 4, 5 und 7 durch den RI	64
Abbildung 4-8: Reinigung des Antigens CD30-mFc	66
Abbildung 4-9: SDS-PAGE des Antigens CD30-mFc	66
Abbildung 4-10: Bindung der monovalenten scFv-Fragmente und bivalenten scFv-Fc Antikörper an das rekombinante Antigen CD30-mFc (Antigen- und Titrations-ELISA)	68
Abbildung 4-11: Immunfärbung zur Bestimmung der Art des erkannten Epitops der Antikörper	69
Abbildung 4-12: Bestimmung der Dimer- und Multimerbildung der scFv-Fragmente	70
Abbildung 4-13: Bestimmung der Antikörperaffinität für das Antigen CD30-mFc	71
Abbildung 4-14: Bindung der scFv-Fc Antikörper an CD30 ⁺ Lymphomzellen	72
Abbildung 4-15: Schematische Übersicht über die Linker zwischen RNase und Antikörper	74
Abbildung 4-16: SDS-PAGEs des Antikörpers SH313-B5-hFc und der ImmunRNasen SH313-B5- hFc-RN1-8	75
Abbildung 4-17: Bestimmung der Komplexbildung des Antikörpers SH313-B5-hFc und der Immun- RNasen SH313-B5-hFc-RN1-8 mittels Größenausschlusschromatographie	76
Abbildung 4-18: Inhibition der RNaseaktivität der ImmunRNasen durch den RI	78
Abbildung 4-19: Bindung der ImmunRNasen an CD30 ⁺ Lymphomzellen	79
Abbildung 4-20: Bindung der ImmunRNasen an CD30 ⁺ Lymphomzellen - Mittlere Fluoreszenz- intensitäten	80
Abbildung 4-21: MTT-Test nach Inkubation von Lymphomzellen mit den ImmunRNasen SH313-B5- hFc-Ad _{mc} -RN1-8 und Kontrollen	81
Abbildung 4-22: Analyse zum Mechanismus des Effektes des Antikörpers SH313-B5-hFc und der ImmunRNasen SH313-B5-hFc-Ad _{mc} -RN3, -RN6 und -RN8 auf Lymphomzellen	83

Abbildung 4-23: Untersuchung der Stabilität des Antikörpers SH313-B5-hFc und einiger Immun- RNasen.....	83
Abbildung 4-24: Nachweis der Internalisierung des Antikörpers SH313-B5-hFc und der Immun- RNasen SH313-B5-hFc-Ad _{mc} -RN3, -RN6 und -RN8 in Lymphomzellen mittels Durchflusszytometrie	84
Abbildung 4-25: Konfokale Laser Scanning Mikroskopie	85
Abbildung 4-26: Nachweis der Internalisierung des Antikörpers SH313-B5-hFc und der Immun- RNasen SH313-B5-hFc-Ad _{mc} -RN3, -RN6, -RN8 in Lymphomzellen mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie	86
Abbildung 4-27: MTT-Test nach Inkubation von Lymphomzellen mit den ImmunRNasen SH313-B5- hFc-RN1-8.....	87
Abbildung 4-28: MTT-Test nach Inkubation von Lymphomzellen mit der ImmunRNase SH313-B5- hFc-RN3 und Kontrollen.....	88

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Lokalisation der acht klassischen humanen RNasen im Körper	4
Tabelle 1-2: Übersicht über die Eigenschaften der acht klassischen humanen RNasen 1-8	7
Tabelle 1-3: Überblick über die humanen Immunglobulinisotypen und ihre Aufgaben.....	9
Tabelle 1-4: Übersicht über die FDA-zugelassenen Antikörper (-konjugate) für die Krebstherapie	14
Tabelle 1-5: Getestete Antikörper und -konjugate gegen CD30 ⁺ Hodgkin Lymphome	24
Tabelle 3-1: Verwendete Geräte	29
Tabelle 3-2: Verwendete Computerprogramme und Datenbanken	30
Tabelle 3-3: Verbrauchsmaterialien.....	31
Tabelle 3-4: Verwendete kommerzielle Kits und Säulen	31
Tabelle 3-5: Enzyme und zugehörige Puffer	32
Tabelle 3-6: Verwendete Antiseren und kommerzielle Antikörper	32
Tabelle 3-7: Verwendete Chemikalien, Lösungen und Puffer.....	32
Tabelle 3-8: Verwendete Mikroorganismen und Zelllinien	36
Tabelle 3-9: Verwendete Medien und Supplemente	36
Tabelle 3-10: Verwendete Vektoren.....	37
Tabelle 3-11: Verwendete Oligonukleotide	37
Tabelle 3-12: Sonstiges	39
Tabelle 3-13: PCR-Programm zur Amplifikation	40
Tabelle 3-14: PCR-Programme zur Amplifikation mit Anfügen von Linkern/Restriktionsschnittstellen	41
Tabelle 3-15: Zusammensetzungen der PCR-Ansätze	41
Tabelle 3-16: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes der Isolation des RNase8-Gens	41
Tabelle 3-17: PCR-Programm der Isolation des RNase8-Gens	42
Tabelle 3-18: Zusammensetzung der Restriktionsverdauansätze	42
Tabelle 3-19: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes	43
Tabelle 3-20: Zusammensetzung eines Sammelgels	47
Tabelle 3-21: Zusammensetzung eines Tenngels	47
Tabelle 3-22: Übersicht über die verwendeten Zelllinien und deren Kultivierung	52
Tabelle 3-23: Transfektions- und Produktionsbedingungen	53
Tabelle 4-1: Geldensitometrische Quantifizierung der gereinigten RNasen 1, 4, 5 und 7	61
Tabelle 4-2: Ermittelte k_{cat}/K_M -Werte der RNasen 1, 4, 5 und 7	63
Tabelle 4-3: Zusammenfassung der Eigenschaften der RNasen	65
Tabelle 4-4: Volumetrische Ausbeuten der CD30-spezifischen Antikörper	67
Tabelle 4-5: Prozentualer Anteil an Mono-, Di- und Multimeren der scFv-Fragmente.....	70
Tabelle 4-6: Zusammenfassung der Ergebnisse der Oberflächenplasmonenresonanz	72
Tabelle 4-7: Zusammenfassung der Eigenschaften der Antikörper	73
Tabelle 4-8: Ermittelte k_{cat}/K_M -Werte der Fusionsproteine SH313-B5-hFc-RNase1-8.....	77

10 Literaturverzeichnis

1. Deshpande, R.A. and V. Shankar, Ribonucleases from T2 family. *Crit Rev.Microbiol.*, 2002. 28: p. 79-122.
2. Yang, W., Nucleases: diversity of structure, function and mechanism. *Q Rev Biophys*, 2011. 44(1): p. 1-93.
3. Fang, E.F. and T.B. Ng, Ribonucleases of different origins with a wide spectrum of medicinal applications. *Biochim Biophys Acta*, 2011. 1815(1): p. 65-74.
4. Schirrmann, T., et al., Targeted therapeutic RNases (ImmunoRNases). *Expert Opin Biol Ther*, 2009. 9(1): p. 79-95.
5. Sorrentino, S., The eight human "canonical" ribonucleases: molecular diversity, catalytic properties, and special biological actions of the enzyme proteins. *FEBS Lett*, 2010. 584(11): p. 2194-200.
6. Matousek, J., Ribonucleases and their antitumor activity. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2001. 129(3): p. 175-91.
7. Raines, R.T., Ribonuclease A. *Chem. Rev.*, 1998(98): p. 1045-1065.
8. Beintema, J.J. and R.G. Kleeneidam, The ribonuclease A superfamily: general discussion. *Cell Mol Life Sci*, 1998. 54(8): p. 825-32.
9. Cho, S., J.J. Beintema, and J. Zhang, The ribonuclease A superfamily of mammals and birds: identifying new members and tracing evolutionary histories. *Genomics*, 2005. 85(2): p. 208-20.
10. Rodriguez, M., et al., Human pancreatic ribonuclease presents higher endonucleolytic activity than ribonuclease A. *Arch Biochem Biophys*, 2008. 471(2): p. 191-7.
11. Nichols, N.M. and D. Yue, Ribonucleases. *Curr Protoc Mol Biol*, 2008. Chapter 3.
12. Gassen, H.G. and H. Witzel, Zum Mechanismus der Ribonuklease-Reaktion. *European J. Biochem.*, 1967. 1 p. 36-45.
13. Holloway, D.E., et al., Crystallographic studies on structural features that determine the enzymatic specificity and potency of human angiogenin: Thr44, Thr80, and residues 38-41. *Biochemistry*, 2004. 43(5): p. 1230-41.
14. Terzyan, S.S., et al., The three-dimensional structure of human RNase 4, unliganded and complexed with d(Up), reveals the basis for its uridine selectivity. *J Mol Biol*, 1999. 285(1): p. 205-14.
15. Sorrentino, S. and D.G. Glitz, Ribonuclease activity and substrate preference of human eosinophil cationic protein (ECP). *FEBS Lett*, 1991. 288(1-2): p. 23-6.
16. Dyer, K.D. and H.F. Rosenberg, The RNase a superfamily: generation of diversity and innate host defense. *Mol. Divers.*, 2006. 10: p. 585-597.
17. Boix, E. and M.V. Nogues, Mammalian antimicrobial proteins and peptides: overview on the RNase A superfamily members involved in innate host defence. *Mol Biosyst*, 2007. 3(5): p. 317-335.
18. Rosenberg, H.F., Eosinophil-derived Neurotoxin / RNase 2: connecting the past, the present and the future. *Curr Pharm Biotechnol.*, 2008. 9(3): p. 135-140.
19. Pai, T.W., et al., Unique Peptide Identification of RNaseA Superfamily Sequences based on Reinforced Merging Algorithms. *J Bioinform Comput Biol.*, 2006. 4: p. 75-92.

20. Sorrentino, S., Human extracellular ribonucleases: multiplicity, molecular diversity and catalytic properties of the major RNase types. *Cell Mol Life Sci*, 1998. 54(8): p. 785-94.
21. Rosenberg, H.F., Recombinant Human Eosinophil Cationic Protein. *Biological Chemistry*, 1995. 270(14): p. 7876-7881.
22. Rosenberg, H.F., The eosinophil ribonucleases. *Cell Mol Life Sci*, 1998. 54(8): p. 795-803.
23. Venge, P. and J. Bystrom, Eosinophil cationic protein (ECP). *Int J Biochem Cell Biol*, 1998. 30(4): p. 433-7.
24. Strydom, D.J., The angiogenins. *Cell Mol Life Sci*, 1998. 54(8): p. 811-24.
25. Tello-Montoliu, A., J.V. Patel, and G.Y. Lip, Angiogenin: a review of the pathophysiology and potential clinical applications. *J Thromb Haemost*, 2006. 4(9): p. 1864-74.
26. Zhang, J., K.D. Dyer, and H.F. Rosenberg, RNase 8, a novel RNase A superfamily ribonuclease expressed uniquely in placenta. *Nucleic Acids Res*, 2002. 30(5): p. 1169-75.
27. Zhang, J., K.D. Dyer, and H.F. Rosenberg, Human RNase 7: a new cationic ribonuclease of the RNase A superfamily. *Nucleic Acids Res*, 2003. 31(2): p. 602-7.
28. Hofsteenge, J., A. Vicentini, and O. Zelenko, Ribonuclease 4, an evolutionarily highly conserved member of the superfamily. *Cell Mol Life Sci*, 1998. 54(8): p. 804-10.
29. Uniprot, Proteindatenbank. <http://www.uniprot.org/>, aufgerufen am 20.12.2011.
30. Gupta, R., E. Jung, and S. Brunak, Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. NetNGlyc 1.0 Server; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>, 2004. In preparation.
31. Gasteiger, E., et al., Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. Humana Press 2005. (In) John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, p. pp. 571-607.
32. Haigis, M.C. and R.T. Raines, Secretory ribonucleases are internalized by a dynamin-independent endocytic pathway. *J Cell Sci*, 2003. 116(Pt 2): p. 313-24.
33. Wu, Y., et al., A study of the intracellular routing of cytotoxic ribonucleases. *J Biol Chem*, 1995. 270(29): p. 17476-81.
34. Leland, P.A., et al., Ribonuclease A variants with potent cytotoxic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(18): p. 10407-12.
35. Janeway, C., *Immunobiology*. Garland Science, 2005. 6th edition.
36. Breitling, F. and S. Dübel, *Rekombinante Antikörper*. Spektrum Verlag, 1997. 1. Auflage.
37. Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and S. Pillai, *Cellular and Molecular Immunology*. Saunders, 2007. 6th Edition.
38. Wu, T.T. and E.A. Kabat, An analysis of the sequences of the variable regions of bence jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J. Exp. Med.*, 1970. 132: p. 211-250.
39. Griffiths, A.D., et al., Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries. *EMBO J*, 1993. 12(2): p. 725-734.
40. Voet, D., et al., *Lehrbuch der Biochemie*. Wiley-VCH, 2002.
41. Dübel, S., *Therapeutic Antibodies - From Past to Future*. Wiley-VCH, 2007. *Handbook of Therapeutic Antibodies*: p. 3-16.

42. Skerra, A. and A. Plückthun, Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* 1988. 240(4855): p. 1038–1041.
43. Schirrmann, T., et al., Production systems for recombinant antibodies. *Frontiers in Bioscience*, 2008. 13: p. 4576-4594.
44. Beckman, R.A., L.M. Weiner, and H.M. Davis, Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors. *Cancer Immunol Immunother*, 2007. 109(2): p. 170–179.
45. Filpula, D. and J. McGuire, Single-chain Fv designs for protein, cell and gene therapeutics. *Exp Opin Ther Patents*, 1999. 9: p. 231–245.
46. Mathew, M. and R.S. Verma, Humanized immunotoxins: a new generation of immunotoxins for targeted cancer therapy. *Cancer Sci*, 2009. 100(8): p. 1359-65.
47. Sharkey, R.M. and D.M. Goldenberg, Targeted therapy of cancer: new prospects for antibodies and immunoconjugates. *CA Cancer J Clin*, 2006. 56(4): p. 226-43.
48. Ortín, M., Immunotherapy of hematological malignancies: what is new? *Ann Oncol.*, 2005. 16(Suppl 2): p. ii53-62.
49. Kreitman, R.J., Immunotoxins for targeted cancer therapy. *Aaps J*, 2006. 8(3): p. E532-51.
50. Neumann, J., Immunbiologie - Eine Einführung. Springer Verlag, 2008.
51. Strome, S., E. Sausville, and D. Mann, A mechanistic perspective of monoclonal antibodies in cancer therapy beyond target-related effects. *Oncologist.*, 2007. 12(9): p. 1084-95.
52. Alderson, K. and P. Sondel, Clinical Cancer Therapy by NK Cells via Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity. *J Biomed Biotechnol.*, 2011. 2011(379123).
53. Levy, E., M. Roberti, and J. Mordoh, Natural killer cells in human cancer: from biological functions to clinical applications. *J Biomed Biotechnol.*, 2011. 2011(676198).
54. Yang, J. and Q. Yi, Therapeutic monoclonal antibodies for multiple myeloma: an update and future perspectives. *Am J Blood Res.*, 2011. 1(1): p. 22-33.
55. Pircher, A., et al., Biomarkers in tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy. *Int J Mol Sci.*, 2011. 12(10): p. 7077-99.
56. Samant, R. and L. Shevde, Recent advances in anti-angiogenic therapy of cancer. *Oncotarget*, 2011. 2(3): p. 122-34.
57. Menzel, C., Targeted RNase: Humane Antikörper-RNase-Fusionen zur Bekämpfung von CD30+ Lymphomen. Dissertation, TU Braunschweig, 2007.
58. Baker, S. and E. Reddy, Targeted inhibition of kinases in cancer therapy. *Mt Sinai J Med.*, 2010. 77(6): p. 573-86.
59. Nelson, A., Antibody fragments: hope and hype. *MAbs*, 2010. 2(1): p. 77-83.
60. Govindan, S. and D. Goldenberg, New antibody conjugates in cancer therapy. *ScientificWorldJournal*, 2010. 12(10): p. 2070-89.
61. Ribas, A., et al., Phase I/II open-label study of the biologic effects of the interleukin-2 immunocytokine EMD 273063 (hu14.18-IL2) in patients with metastatic malignant melanoma. *J Transl Med*, 2009. 7(68).
62. Egawa, K., Immuno-cell therapy of cancer in Japan. *Anticancer Res.*, 2004. 24(5C): p. 3321-6.

63. Gillies, S., et al., Antibody-targeted interleukin 2 stimulates T-cell killing of autologous tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. 89(4): p. 1428-32.
64. Kovtun, Y., et al., Antibody-drug conjugates designed to eradicate tumors with homogeneous and heterogeneous expression of the target antigen. *Cancer Res*, 2006. 66(6): p. 3214-21.
65. Kreitman, R.J., Recombinant immunotoxins containing truncated bacterial toxins for the treatment of hematologic malignancies. *BioDrugs*, 2009. 23(1): p. 1-13.
66. Baluna, R. and E.S. Vitetta, Vascular leak syndrome: a side effect of immunotherapy. *Immunopharmacology*, 1997. 37(2-3): p. 117-32.
67. Holzman, D.C., Whatever happened to immunotoxins? Research, and hope, are still alive. *J Natl Cancer Inst*, 2009. 101(9): p. 624-5.
68. Gerber, H.P., Emerging immunotherapies targeting CD30 in Hodgkin's lymphoma. *Biochem Pharmacol*, 2010. 79(11): p. 1544-52.
69. Falini, B., et al., CD30 (Ki-1) molecule: a new cytokine receptor of the tumor necrosis factor receptor superfamily as a tool for diagnosis and immunotherapy. *Blood*, 1995. 85(1): p. 1-14.
70. Watanabe, M., et al., Hypomethylation of CD30 CpG islands with aberrant JunB expression drives CD30 induction in Hodgkin lymphoma and anaplastic large cell lymphoma. *Laboratory Investigation*, 2008. 88: p. 48-57.
71. Horie, R. and T. Watanabe, CD30: expression and function in health and disease. *Semin Immunol*, 1998. 10(6): p. 457-70.
72. Stein, H., et al., CD30(+) anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic, and clinical features. *Blood*, 2000. 96(12): p. 3681-95.
73. Fouladi, F., Die Rolle von NF- κ B für die CD30-vermittelte Signaltransduktion beim Anaplastischen Großzelligen Lymphom (ALCL); Dissertation, Freie Universität Berlin, Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie, 2008.
74. Hübinger, G., et al., CD30-mediated cell cycle arrest associated with induced expression of p21(CIP1/WAF1) in the anaplastic large cell lymphoma cell line Karpas 299. *Oncogene*, 2001. 20(5): p. 590-8.
75. Böll, B., P. Borchmann, and A. Engert, Experimentelle Therapie des Hodgkin-Lymphoms. *Onkologe*, 2010. 16: p. 48-54.
76. Menzel, C., et al., Human antibody RNase fusion protein targeting CD30+ lymphomas. *Blood*, 2008. 111(7): p. 3830-7.
77. Halbsguth, T., V. Göde, and S. Knop, <http://www.lymphome.de/InfoLymphome>; Universitätsklinikum Köln (AöR), aufgerufen am 22.11.2011 (Kompetenznetz Maligne Lymphome e.V.).
78. Küppers, R., J. Yahalom, and A. Josting, Advances in biology, diagnostics, and treatment of Hodgkin's disease. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2006. 12(1 Suppl 1): p. 66-76.
79. Hertel, C.B., et al., Loss of B cell identity correlates with loss of B cell-specific transcription factors in Hodgkin/Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma. *Oncogene*, 2002. 21(32): p. 4908-20.
80. Cossman, J., et al., Reed-Sternberg cell genome expression supports a B-cell lineage. *Blood*, 1999. 94(2): p. 411-6.
81. Park, S., et al., Primary Systemic Anaplastic Large Cell Lymphoma in Korean Adults: 11 Years' Experience at Asan Medical Center. *Yonsei Med J*, 2008. 49(4): p. 601-609.

82. Higuchi, M., et al., Elevated expression of CD30 in adult T-cell leukemia cell lines: possible role in constitutive NF- κ B activation. *Retrovirology*, 2005. 2(29).
83. Pallesen, G. and S. Hamilton-Dutoit, Ki-1 (CD30) antigen is regularly expressed by tumor cells of embryonal carcinoma. *Am J Pathol*, 1988. 133(3): p. 446–450.
84. Mechttersheimer, G. and P. Möller, Expression of Ki-1 antigen (CD30) in mesenchymal tumors. *Cancer Immunol Immunother*, 1990. 66(8): p. 1732-7.
85. Schütte, M., et al., Identification of a putative Crf splice variant and generation of recombinant antibodies for the specific detection of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One*, 2009. 4(8): p. e6625.
86. Mullis, K., et al., Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1986. 51 (Pt 1): p. 263-73.
87. Kelemen, B.R., et al., Hypersensitive substrate for ribonucleases. *Nucleic Acids Res*, 1999. 27(18): p. 3696-701.
88. GE_Healthcare, CypHer5E Mono NHS Ester. <http://www.gehealthcare.com/lifesciences>, 2006.
89. Klink, T.A., et al., High-level soluble production and characterization of porcine ribonuclease inhibitor. *Protein Expr Purif*, 2001. 22(2): p. 174-9.
90. Hust, M., L. Toleikis, and S. Dübel, Selection Strategies II: Antibody Phage Display. Wiley-VCH, 2007. *Handbook of Therapeutic Antibodies*: p. 45–68.
91. Biacore, BIAevaluation Software Handbook. 1997. Version 3.0.
92. Hetzel, C., et al., Small cleavable adapters enhance the specific cytotoxicity of a humanized immunotoxin directed against CD64-positive cells. *J Immunother*, 2008. 31(4): p. 370-6.
93. Heisler, I., et al., A cleavable adapter to reduce nonspecific cytotoxicity of recombinant immunotoxins. *Int J Cancer*, 2003. 103(2): p. 277-82.
94. Robert-Koch-Institut., Krebs in Deutschland 2005/2006 - Häufigkeiten und Trends. www.rki.de/krebs; www.gekid.de, 2010. 7. Ausgabe.
95. Palanca-Wessels, M. and O. Press, Improving the efficacy of radioimmunotherapy for non-Hodgkin lymphomas. *Cancer Immunol Immunother*, 2010. 116(4 Suppl): p. 1126-33.
96. Jona, A. and A. Younes, Novel treatment strategies for patients with relapsed classical Hodgkin lymphoma. *Blood Rev.*, 2010. 24(6): p. 233-8.
97. Foyil, K.V. and N.L. Bartlett, Anti-CD30 Antibodies for Hodgkin lymphoma. *Curr Hematol Malig Rep*, 2010. 5(3): p. 140-7.
98. Kawakami, K., et al., Targeted anticancer immunotoxins and cytotoxic agents with direct killing moieties. *ScientificWorldJournal*, 2006. 6: p. 781-90.
99. Pinter-Brown, L.C., SGN-30: a basis for the effective treatment of CD30 positive hematopoietic malignancies. *Expert Opin Investig Drugs*, 2008. 17(12): p. 1883-7.
100. Futami, J., et al., Recombinant human pancreatic ribonuclease produced in *E. coli*: importance of the amino-terminal sequence. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995. 216(1): p. 406-13.
101. McGeehan, G.M. and S.A. Benner, An improved system for expressing pancreatic ribonuclease in *Escherichia coli*. *FEBS Lett*, 1989. 247(1): p. 55-6.
102. Ribo, M., et al., Production of human pancreatic ribonuclease in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 1996. 7(3): p. 253-61.

103. delCardayre, S.B., et al., Engineering ribonuclease A: production, purification and characterization of wild-type enzyme and mutants at Gln11. *Protein Eng*, 1995. 8(3): p. 261-73.
104. Boix, E., et al., Role of the N terminus in RNase A homologues: differences in catalytic activity, ribonuclease inhibitor interaction and cytotoxicity. *J Mol Biol*, 1996. 257(5): p. 992-1007.
105. Bleick, S., Rekombinante Produktion humaner RNasen in *Escherichia coli* für vergleichende Analysen. Masterarbeit, Technische Universität Braunschweig, 2010.
106. Rehm, H. and T. Letzel, *Der Experimentator: Proteinbiochemie / Proteomics*. Spektrum Akademischer Verlag, 2010.
107. Dwek, R. and T. Butters, Introduction: Glycobiology - Understanding the Language and Meaning of Carbohydrates. *Chem. Rev.*, 2002. 102 (2): p. 283–284.
108. Barrabés, S., et al., Glycosylation of serum ribonuclease 1 indicates a major endothelial origin and reveals an increase in core fucosylation in pancreatic cancer. *Glycobiology*, 2007. 17(4): p. 388-400.
109. Carter, J., et al., Fusion partners can increase the expression of recombinant interleukins via transient transfection in 2936E cells. *Protein Sci*, 2010. 19(2): p. 357-62.
110. Sorrentino, S. and M. Libonati, Human pancreatic-type and nonpancreatic-type ribonucleases: a direct side-by-side comparison of their catalytic properties. *Arch Biochem Biophys*, 1994. 312(2): p. 340-8.
111. Fang, L., et al., An improved strategy for high-level production of TEV protease in *Escherichia coli* and its purification and characterization. *Protein Expr Purif*, 2007. 51(1): p. 102-9.
112. Henrichs, T., et al., Target-directed proteolysis at the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(12): p. 4246-51.
113. Cabrita, L., et al., Enhancing the stability and solubility of TEV protease using in silico design. *Protein Sci.*, 2007. 16(11): p. 2360-7.
114. Shih, Y., et al., Self-cleavage of fusion protein in vivo using TEV protease to yield native protein. *Protein Sci.*, 2005. 14(4): p. 936-41.
115. Kapust, R., K. Routzahn, and D. Waugh, Processive degradation of nascent polypeptides, triggered by tandem AGA codons, limits the accumulation of recombinant tobacco etch virus protease in *Escherichia coli* BL21(DE3). *Protein Expr Purif.*, 2002. 24(1): p. 61-70.
116. Rehman, M., et al., Functional role of glutamine 28 and arginine 39 in double stranded RNA cleavage by human pancreatic ribonuclease. *PLoS One*, 2011. 6(3): p. e17159.
117. Harder, J. and J.M. Schroder, RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J Biol Chem*, 2002. 277(48): p. 46779-84.
118. Bosch, M., et al., A nuclear localization sequence endows human pancreatic ribonuclease with cytotoxic activity. *Biochemistry*, 2004. 43(8): p. 2167-77.
119. Suzuki, M., et al., Engineering receptor-mediated cytotoxicity into human ribonucleases by steric blockade of inhibitor interaction. *Nat Biotechnol.*, 1999. 17(3): p. 265-70.
120. Wu, Y., et al., A cytotoxic ribonuclease. Study of the mechanism of onconase cytotoxicity. *J Biol Chem*, 1993. 268(14): p. 10686-93.
121. Turcotte, R.F., L.D. Lavis, and R.T. Raines, Onconase cytotoxicity relies on the distribution of its positive charge. *Febs J*, 2009. 276(14): p. 3846-57.

122. Jain, M., N. Kamal, and S. Batra, Engineering antibodies for clinical applications. *Trends Biotechnol.*, 2007. 25(7): p. 307-16.
123. Russo, N., et al., Expression in mammalian cells, purification and characterization of recombinant human pancreatic ribonuclease. *FEBS Lett*, 1995. 369(2-3): p. 352.
124. Willuda, J., et al., High thermal stability is essential for tumor targeting of antibody fragments: engineering of a humanized anti-epithelial glycoprotein-2 (epithelial cell adhesion molecule) single-chain Fv fragment. *Cancer Res*, 1999. 59(22): p. 5758-67.
125. Nagata, S., et al., Novel anti-CD30 recombinant immunotoxins containing disulfide-stabilized Fv fragments. *Clin Cancer Res*, 2002. 8(7): p. 2345-55.
126. Schier, R. and J. Marks, Efficient in vitro affinity maturation of phage antibodies using BIAcore guided selections. *Hum Antibodies Hybridomas.*, 1996. 7(3): p. 97-105.
127. Adams, G., et al., Increased affinity leads to improved selective tumor delivery of single-chain Fv antibodies. *Cancer Res*, 1998. 58(3): p. 485-90.
128. Adams, G., et al., High affinity restricts the localization and tumor penetration of single-chain fv antibody molecules. *Cancer Res.*, 2001. 61(12): p. 4750-5.
129. Jones, D., A. Silverman, and J. Cochran, Developing therapeutic proteins by engineering ligand-receptor interactions. *Trends Biotechnol.*, 2008. 26(9): p. 498-505.
130. Schellekens, H., Factors influencing the immunogenicity of therapeutic proteins. *Nephrol Dial Transplant.*, 2005. 20(Suppl 6): p. 3-9.
131. Bachran, C., et al., The saponin-mediated enhanced uptake of targeted saporin-based drugs is strongly dependent on the saponin structure. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2006. 231(4): p. 412-20.
132. Schirrmann, T., et al., Oligomeric forms of single chain immunoglobulin (scIgG). *MAbs*, 2010. 2(1): p. 73-6.
133. Newton, D.L., et al., Expression and characterization of recombinant human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil-derived neurotoxin-anti-transferrin receptor sFv. *J Biol Chem*, 1994. 269(43): p. 26739-45.
134. Atkins, P. and J. De Paula, *Physical Chemistry*. Oxford University Press, 2006. 8. Edition: p. 810.
135. Kim, J., et al., Mechanism of ribonuclease cytotoxicity. *J Biol Chem.*, 1995. 270(52): p. 31097-102.
136. Notomista, E., et al., The role of electrostatic interactions in the antitumor activity of dimeric RNases. *Febs J*, 2006. 273(16): p. 3687-97.
137. Hansen, H., et al., CD30 shedding from Karpas 299 lymphoma cells is mediated by TNF-alpha-converting enzyme. *J Immunol.*, 2000. 165(12): p. 6703-9.
138. Hansen, H., et al., The ectodomain shedding of CD30 is specifically regulated by peptide motifs in its cysteine-rich domains 2 and 5. *FASEB J*, 2004. 18(7): p. 893-5.
139. Durkop, H., et al., Molecular cloning and expression of a new member of the nerve growth factor receptor family that is characteristic for Hodgkin's disease. *Cell*, 1992. 68(3): p. 421-7.
140. Lee, S.Y., C.G. Park, and Y. Choi, T cell receptor-dependent cell death of T cell hybridomas mediated by the CD30 cytoplasmic domain in association with tumor necrosis factor receptor-associated factors. *J Exp Med*, 1996. 183(2): p. 669-74.

141. Bachran, C., Tumorspezifische chimäre Toxine: Konstruktion, biochemische Charakterisierung und Analyse ihrer therapeutischen Bedeutung. Dissertation, Freie Universität Berlin, Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie, 2006.
142. De Lorenzo, C., et al., Intracellular route and mechanism of action of ERB-hRNase, a human anti-ErbB2 anticancer immunoagent. *FEBS Lett*, 2007. 581(2): p. 296-300.
143. Aizawa, S., et al., Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 5 and TRAF2 are involved in CD30-mediated NFkappaB activation. *J Biol Chem*, 1997. 272(4): p. 2042-5.
144. Ansieau, S., et al., Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)-1, TRAF-2, and TRAF-3 interact in vivo with the CD30 cytoplasmic domain; TRAF-2 mediates CD30-induced nuclear factor kappa B activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(24): p. 14053-8.
145. Lee, J., et al., Receptor mediated uptake of peptides that bind the human transferrin receptor. *Eur J Biochem.*, 2001. 268(7): p. 2004-12.
146. Schütze, S., et al., Inhibition of receptor internalization by monodansylcadaverine selectively blocks p55 tumor necrosis factor receptor death domain signaling. *J Biol Chem.*, 1999. 274(15): p. 10203-12.
147. Vuk-Pavlović, S. and J. Kovach, Recycling of tumor necrosis factor-alpha receptor in MCF-7 cells. *FASEB J*, 1989. 3(14): p. 2633-40.
148. Okeley, N., et al., Intracellular activation of SGN-35, a potent anti-CD30 antibody-drug conjugate. *Clin Cancer Res.*, 2010. 16(3): p. 888-97.
149. Krauss, J., et al., Efficient killing of CD22+ tumor cells by a humanized diabody-RNase fusion protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. 331(2): p. 595-602.
150. Koopman, G., et al., Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 1994 84(5): p. 1415-20.
151. Vermes, I., et al., A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*, 1995 184(1): p. 39-51.
152. Krishan, A., Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol.*, 1975. 66(1): p. 188-93.

11 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 2009 bis Februar 2012 in der Abteilung Biotechnologie des Instituts für Biochemie, Biotechnologie und Bioinformatik an der Technischen Universität Braunschweig durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stefan Dübel für die Möglichkeit der Promotion in seiner Arbeitsgruppe, für die wissenschaftliche Betreuung und viele hilfreiche Anregungen.

Herrn Prof. Dr. Robert Hänsch danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und die Einführung in die konfokale Laser Scanning Mikroskopie.

Herrn Prof. Dr. Michael Steinert danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. Thomas Schirrmann, PD Dr. Micheal Hust und Dr. André Frenzel für die fachlichen Diskussionen und Anregungen. Ihnen und allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für das angenehme Arbeitsklima, den freundschaftlichen Umgang miteinander sowie für die gegenseitige Unterstützung.

Ich danke Dr. Zoltan Konthur für die Bereitstellung des 4E3-Antikörpergens und der cDNA für die Isolation der RNase-Gene und Saskia Helmsing für die Durchführung des Pannings gegen CD30.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere meinen Eltern, für den Rückhalt und die bedingungslose und liebevolle Unterstützung in jeder Lebenslage.

A Anhang

A.1 Bestimmung von Proteinkomplexen der ImmunRNasen SH313-B5-hFc-Ad_{mc}-RN1-8 mittels Größenausschlusschromatographie

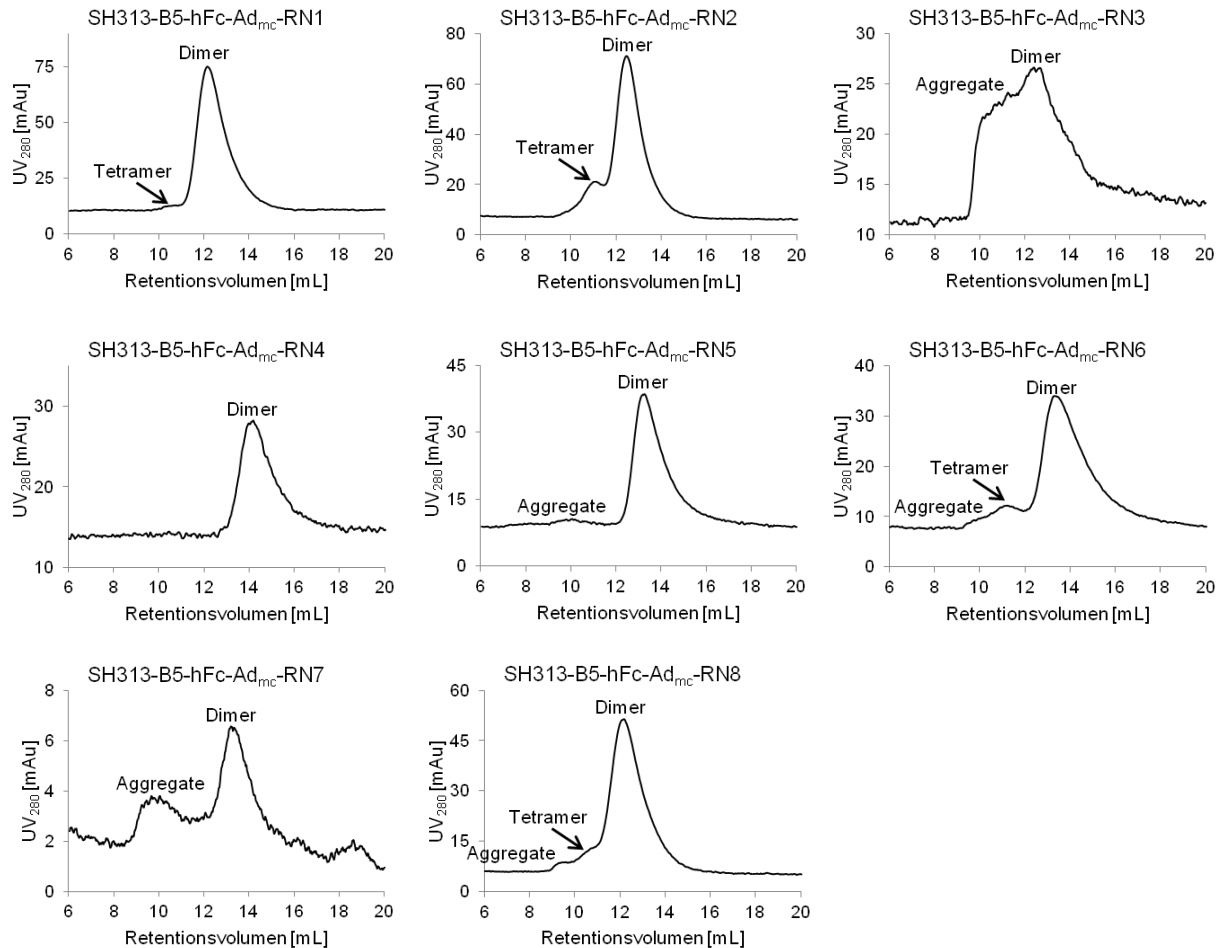


Abbildung A-1: Bestimmung der Komplexbildung der ImmunRNasen SH313-B5-hFc-Ad_{mc}-RN1-8 mittels Größenausschlusschromatographie

Analytische Größenausschlusschromatographie zur Bestimmung der Komplexbildung der Proteine SH313-B5-hFc-Ad_{mc}-RN1-8. Als Laufpuffer wurde PBS benutzt. Es wurde die Säule Superdex200 10/300 GL (Trennleistung 10-600 kDa) mit einer Flussrate von 0,3 mL/min eingesetzt und jeweils 100 µg der Proteine aufgetrennt. In den Chromatogrammen ist die Absorption bei 280 nm in Bezug zu der Retentionszeit des jeweiligen Proteins dargestellt. Die Skalierung der Ordinate wurde je nach Absorptionswert des Proteins variiert.

A.2 Zeitliche Abnahme der CD30-Konzentration in der Karpas299-Kultur während der Internalisierung des Antikörpers SH313-B5-hFc

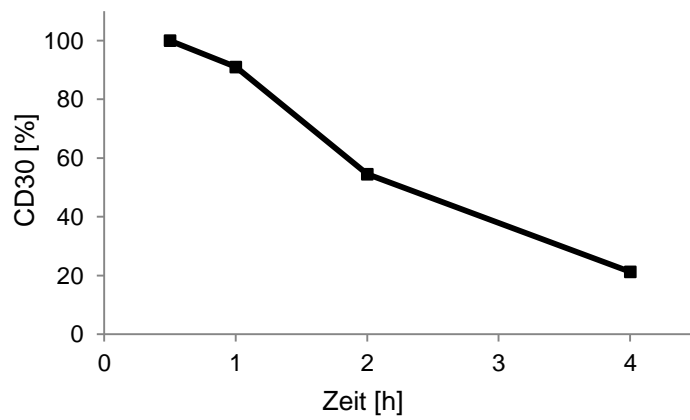


Abbildung A-2: Detektierte Menge an CD30 in der Karpas299-Kultur während der Internalisierung des Antikörpers SH313-B5-hFc im Verlauf von 4 h. Die Menge an CD30 nach 0,5 h wurde als Referenz auf 100 % gesetzt.